



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Orgánica

**Derivados multivalentes de triptófano
como inhibidores duales de la
replicación de VIH y EV71**

Tesis Doctoral

Belén V. Martínez Gualda
Madrid, 2017

Dña. MARÍA JOSÉ CAMARASA RIUS Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Dña. ANA ROSA SAN FÉLIX GARCÍA Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que el trabajo reflejado en la presente Memoria titulada “**Derivados multivalentes de triptófano como inhibidores duales de la replicación de VIH y EV71**” ha sido realizado en el Departamento de Química Médica III del Instituto de Química Médica (CSIC) por Dña. Belén V. Martínez Gualda y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, marzo de 2017

Fdo: María José Camarasa Rius

Fdo: Ana Rosa San Félix García

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiologic agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), is an enveloped retrovirus with glycoproteins gp120 and gp41 on its surface while enterovirus A71 (EV71), the etiologic agent of hand, foot and mouth disease (HFMD), is a non-enveloped (+)RNA virus (genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*).

At present there are almost 30 approved drugs for the treatment of AIDS. These compounds, which are administered in the so-called Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART), are targeted to the viral enzymes integrase, reverse transcriptase and protease. Although HAART keeps the disease under control, is often associated with the emergence of side-effects. These limitations highlight the need for new lead compounds and/or novel therapeutic concepts to fight against HIV. The HIV entry into its target cells represents an attractive target for the development of novel anti-AIDS therapy. Drugs that interfere in this early event may represent an advantage over other existing therapeutic approaches targeting the above viral enzymes since they may show efficacy against resistant virus and prevent the uptake of the virus by uninfected CD4-positive cells. To date, only two entry inhibitors have been approved by the FDA, enfuvirtide (T20), a 36-amino acid peptide that binds to the viral glycoprotein gp41, and maraviroc, a small-molecule CCR5-antagonist.

The situation is completely different for EV71 infection for which there are no approved drugs. As already mentioned, this virus is the etiologic agent of hand, foot and mouth disease (HFMD), a mild syndrome that affects mostly children below 6 years old. Unlike other HFMD-related enteroviruses, EV71 also may cause severe neurological problems like aseptic meningitis and brainstem encephalitis, which may lead to cardiopulmonary failure and death. Large EV71 outbreaks have been reported throughout the world but they have been especially severe in the Pacific region of Asia. A very recent outbreak of enterovirus infection in Catalonia, Spain, with 73 cases with neurological complications, suggests that the epidemiological pattern of EV71 is going through a change also in Europe. Therefore, effective antivirals are urgently needed for the prophylaxis or treatment of patients with severe EV71 infections.

Previous work of our group has led to a new family of dendrimers containing different central scaffolds and multiple (9 to 18) tryptophans (Trp) on the periphery, whose prototype is the pentaerythritol derivative **AL-385** (Fig. 1). This compound inhibits both HIV and EV71 replication in micromolar range and showed an amazing increase of activity against a large panel of clinical isolates of EV71.

Regarding HIV, the activity is probably due to the interaction of the compound with glycoproteins gp120 and gp41 of the viral surface while for EV71 the mechanism of action is still under investigation.

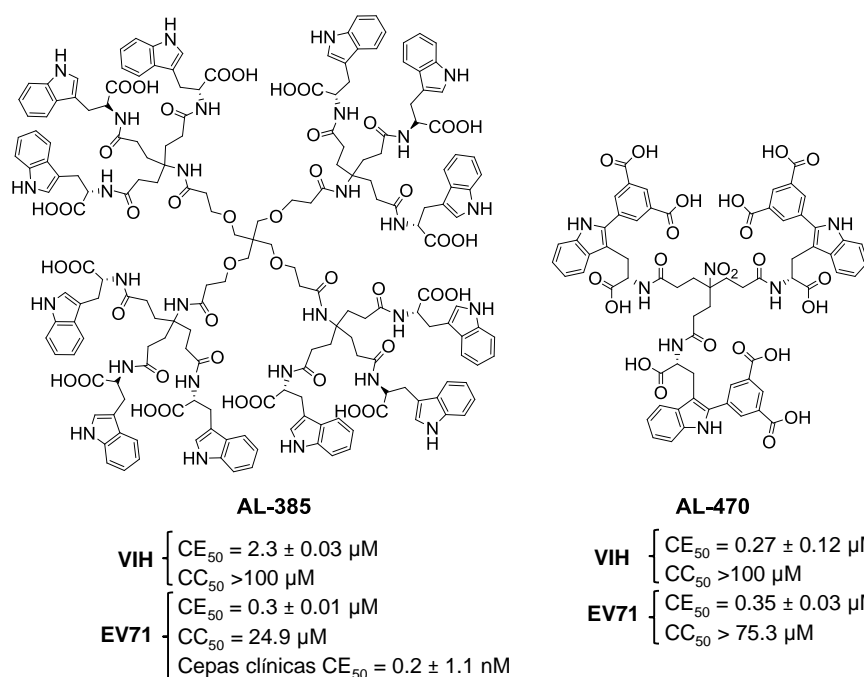


Figure 1. Structure and antiviral activity of the prototypes **AL-385** and **AL-470**

Taking compound **AL-385** as the prototype, structure-activity relationship studies to identify the structural requirements for activity against HIV and EV71 have been performed. With this aim, dendrimers modified on the periphery (chapter 1) and on the spacer arm (chapter 2) have been synthesized. In addition, compounds of lower molecular weight than the prototype **AL-385** that retain activity against both viruses have been prepared (chapter 3). Finally, preliminary experiments to determine the mechanism of action of this family of compounds against EV71 have been described in the chapter 4. For these experiments dendrimer **AL-385** and trimer **AL-470** (Fig. 1), a novel prototype discovered in chapter 3, have been used.

1- Modifications on the periphery (Chapter 1)

Structure-activity relationship studies on the periphery have been performed by replacing the Trps present in **AL-385** by different amino acids, non-aromatic such as alanine and aromatic such as phenylalanine or tyrosine. In addition a triptamine derivative (a decarboxylated analogue of Trp) has been prepared to determine the role of the carboxylic acids on the activity. The *N*-methyl Trp derivative was also prepared to determine whether the NH of indol moiety is important for activity (Fig. 2).

Our studies led to the conclusion that aromatic amino acids as tryptophan and tyrosine, with free COOHs, are required for anti-HIV and anti-EV71 activity. The presence of carboxylic acids on the periphery is crucial for the activity since the triptamine derivative, without carboxylic acids, was inactive against both viruses. As with the prototype, the tyrosine

derivative also showed activity in the low nanomolar/high picomolar range against a large panel of clinical isolates of EV71.

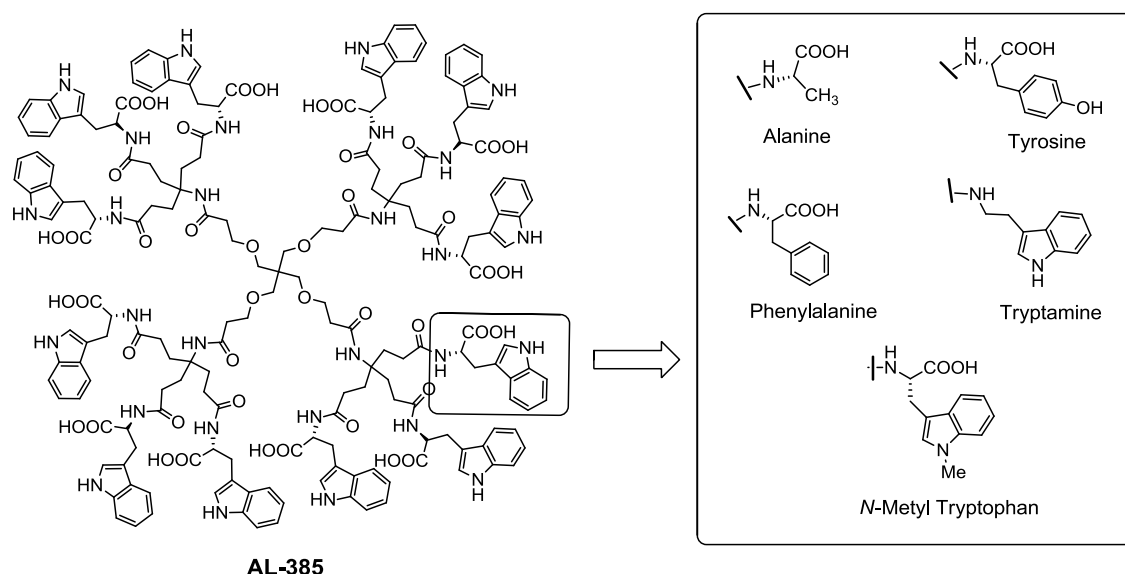


Figure 2. Modifications on the periphery described in the chapter 1

Time of addition experiments showed that the tyrosine derivative inhibits early steps of the life cycle of EV71. Moreover, Surface Plasmon Resonance studies for HIV showed that this compound interacts with glycoproteins gp120 and gp41 on the viral surface. The K_D values (affinity constant) observed for this compound were better than those observed for the prototype **AL-385**.

Finally, in this chapter we describe a new synthetic procedure based on a convergent approach for the preparation of **AL-385** and some other dendrimers. This convergent approach proved to be more efficient (higher yields and easier purifications) than the divergent approach previously used.

2- Modifications on the spacers (Chapter 2)

To determine the importance of the trivalent spacer arms (general structure **A**, Fig. 3) of the prototype **AL-385** on the activity, we prepared novel dendrimers with lower and higher branching degree. In particular, divalent spacer arms of general structure **B** (Fig. 3), that would drive the molecule into a more expanded shape, have been chosen. The tetravalent spacer arms (general structure **C**) have been used to maximize multivalent effects. In these molecules central cores of different architecture with 4 (**a**) or 3 (**b-d**) carboxylic acids as attachment points have been used. Convergent and divergent approaches were used for the synthesis of these compounds.

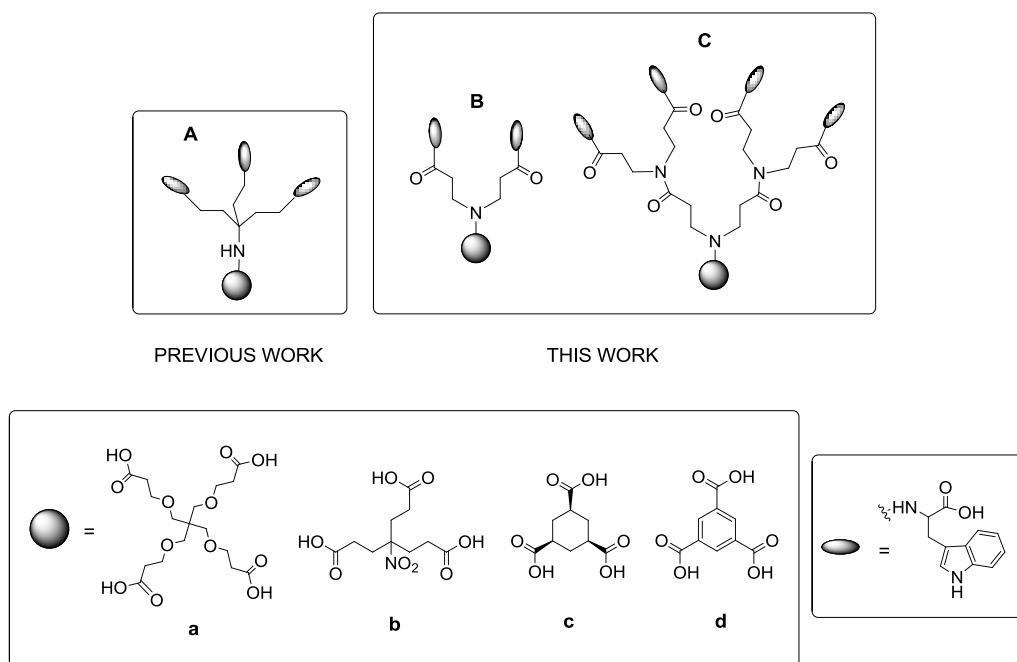


Figure 3. Modifications on the spacers arms described in the chapter 2

The HIV activity of compounds with bivalent and tetravalent spacers arms were very similar among them and also similar to that of the prototype.

The dendrimers bearing bivalent spacers arms were inactive against EV71, while dendrimers bearing tetravalent spacers arms showed similar activity to that of the prototype **AL-385**. Independently of the type of spacer arm, compounds with a pentaerythritol central scaffold were the most active against both HIV and EV71 viruses.

Tetravalent spacer arms dendrimers were also assayed against a broad panel of viruses, showing significant inhibitory activity against Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2), a genital herpes that is considered as a major risk factor in HIV infection and rapid progression to AIDS. These compounds might be good candidates to develop microbicides to inhibit the replication of both viruses, HIV and HSV-2.

3- N1, C2 and C7 arylated tryptophan derivatives (Chapter 3)

The main goal of the work developed in this chapter was to minimize the structural complexity of the prototype **AL-385**. Thus “truncated” analogues (**I** and **II**, Fig. 4) of the prototype, with only 3 or 4 Trps on the periphery were prepared. However, these compounds resulted inactive against HIV and EV71. To restore the antiviral activity we “decorated” **I** and **II** with moieties that could potentially participate with “extra” interactions in their binding site. Our hypothesis was that these “extra” interactions could compensate for the loss of Trps with respect to the prototype. Preferentially, aromatic rings functionalized with COOHs were used as substituents because, according to our SAR studies both, aromaticity and COOHs, are

beneficial for activity. To introduce these moieties the particular reactivity of the indole ring of the side-chain of the Trps was explored. As attachment points the N1, C2 and C7 positions of the indol moiety were chosen. A metal-catalyzed (Pd^{II}) cross-coupling reaction was developed for the synthesis of the C2 and C7 arylated compounds. N1 arylated compounds were performed by alkylation reactions in basic medium.

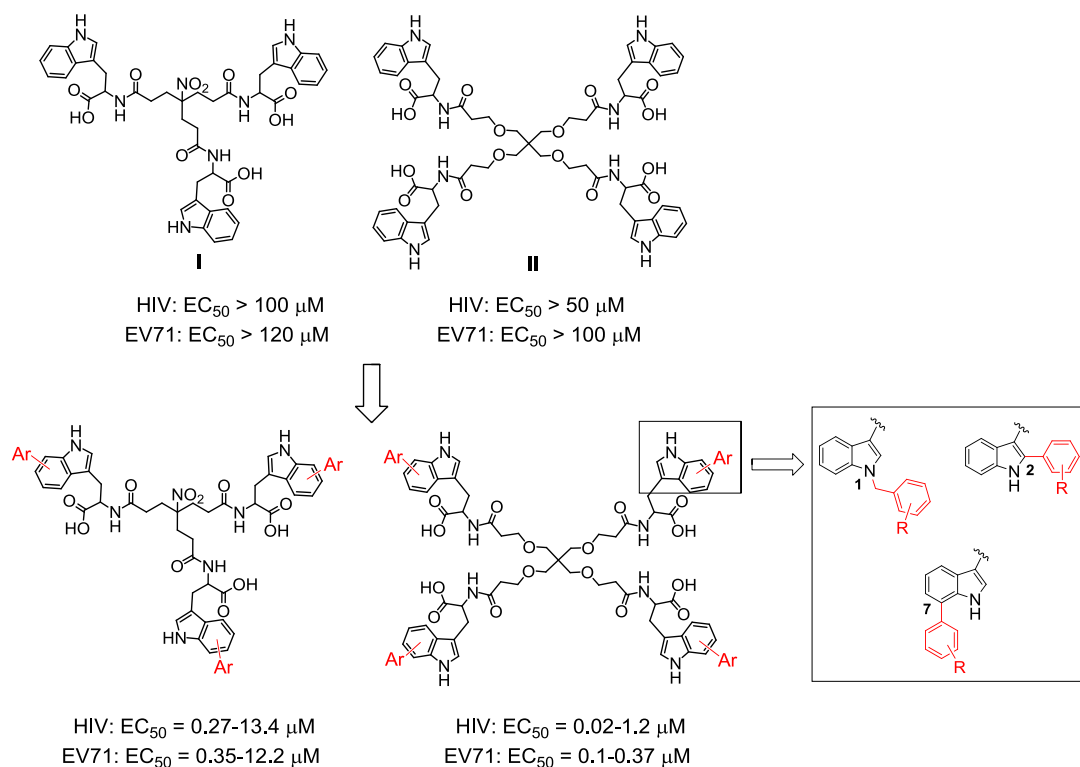


Figure 4. Structure of trimers and tetramers described in the chapter 3

Our biological results showed that only aromatic rings with 1 or 2 carboxylic acids at the C2 or C7 positions of the indole ring of Trp were able to restore the activity against HIV and EV71, while the N1 arylated compounds were inactive against both viruses. These results highlighted C2 and C7 positions as critical for activity and opened possibilities for further development of this family of compounds.

Trimers and tetramers were 10 to 100 fold more active against HIV and equally active against EV71, than the prototype **AL-385** while their molecular weights were considerably smaller.

Trimer **21** (**AL-470**, Fig. 1) was selected as a new prototype for further biological studies. This new prototype has some advantages over the dendrimer **AL-385**. First, **AL-470** has a substantial reduced size with respect to **AL-385** (1328.20 Da *versus* 3575.84 Da). Second, **AL-470** has a nitro group in its focal point that could be transformed into an amino group for diversification, something difficult with **AL-385**. Moreover, the synthesis of **AL-470** is easier and less expensive than that of **AL-385**.

4- Additional biological assays carried on with the prototypes **AL-385** and **AL-470** (compound 21) (Chapter 4)

In this chapter biological studies to determine the mechanism of action against EV71 and the activity *in vivo* of the two prototypes **AL-385** and **AL-470** have been described.

A time of addition experiment carried out with dendrimer **AL-385** showed that this compound inhibits an early step (entry) of the life cycle of EV71. Moreover, a thermo-stability assay showed that **AL-385** behaves like suramin, an entry inhibitor that interacts with the positively charged surface of VP1 capsid protein and differently to pirodavir, an entry inhibitor that interacts with the hydrophobic pocket of VP1 capsid protein. This result suggests that **AL-385** does not interact with the VP1 hydrophobic pocket and probably interacts with the viral capsid protein.

Two viral resistant strains to **AL-385** were selected. These strains showed two amino acid mutations (S184T and P246S) in the VP1 capsid protein close to the five-fold axis where the host cell receptor binds. Recombinant viruses with these mutations showed lower susceptibility to the inhibitory action of **AL-385** than that of the wild type virus, while no significant changes were observed to the inhibitory action of other entry inhibitors (vapedavir, pirodavir and suramin). This result suggests that **AL-385** belongs to a different pharmacological family than the other EV71 entry inhibitors.

Cross-resistant assays carried out with **AL-470** showed that the recombinant viruses were more susceptible to the inhibitory action of **AL-470** than to the **AL-385**. This result suggests that **AL-470** might not share the binding site with **AL-385**.

To localize **AL-470** on the viral capsid, a fluorescent derivative of **AL-470**, with fluorescein as chromophore, was synthesized. This compound was more active against EV71 than the two prototypes (**AL-385** and **AL-470**). However, the fluorescent results were not conclusive and should be repeated.

Finally, we prepared the sodium salt of the prototype **AL-470** to start *in vivo* assays in EV71 mouse-adapted strain. This salt was 74 fold more soluble than **AL-470** in aqueous solution and also showed stability over time at different pHs (1.5, 5.5 and 7.4). With this excellent candidate *in vivo* assays have been started and the first results will come soon.

ABREVIATURAS

CCTLC	Centrifugal Circular Thin Layer Chromatography (cromatografía circular centrífuga en capa fina)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
ESI	Electrospray Ionization (ionización por electrospray)
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alto rendimiento)
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight
MOI	Multiplicity Of Infection (multiplicidad de infección)
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRM	Pradimicin
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RU	Resonance Units (unidades de resonancia)
SPR	Surface Plasmon Resonance (resonancia de plasmón de superficie)
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose
TFA	Trifluoroacetic acid

ÍNDICE

ABSTRACT	i
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE	viii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	3
Entrada/fusión del VIH: una diana prometedora en el tratamiento anti-VIH	8
La glicoproteína gp120 como diana terapéutica	11
Los carbohidratos de la glicoproteína gp120 como diana terapéutica	13
El Enterovirus 71	14
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES	22
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	29
CAPÍTULO 1: Modificaciones en la periferia del prototipo AL-385	37
Síntesis de dendrímeros	40
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
Síntesis de los dendrímeros modificados en la periferia	41
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	45
Estudios de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	47
Evaluación de los compuestos frente a la replicación del EV71	49
CONCLUSIONES	52
PARTE EXPERIMENTAL	54
BIBLIOGRAFÍA	63
CAPÍTULO 2: Modificaciones en los espaciadores del prototipo AL-385	65
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
Síntesis de los dendrímeros con espaciadores divalentes	67
Síntesis de los dendrímeros con espaciadores tetravalentes	69
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	72
Evaluación de los compuestos frente a la replicación del EV71	73
CONCLUSIONES	76
PARTE EXPERIMENTAL	77

BIBLIOGRAFÍA	89
CAPÍTULO 3: Trímeros y tetrámeros con actividad dual frente al VIH y EV71	91
REACTIVIDAD DEL INDOL Y TRIPTÓFANO	94
El anillo de indol, una “estructura privilegiada” y su reactividad	94
Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación de indoles y triptófanos	96
Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación directa de indoles y triptófanos en posición C2	97
Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación de indoles y triptófanos en posición C7	100
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	101
Síntesis de los compuestos arilados en la posición C2 del anillo de indol	101
Síntesis de los compuestos arilados en la posición C7 del anillo de indol	104
Síntesis de los compuestos arilados en la posición N1 del anillo de indol	106
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	107
Evaluación de los compuestos frente a la replicación del EV71	109
CONCLUSIONES	112
PARTE EXPERIMENTAL	114
BIBLIOGRAFÍA	132
CAPÍTULO 4: Estudio sobre el mecanismo de acción frente a EV71	135
ENSAYOS BIOLÓGICOS LLEVADOS A CABO CON EL DENDRÍMERO AL-385	138
Experimento de tiempo de adición	138
Estabilidad de la partícula viral	139
Selección y caracterización de cepas virales resistentes	139
EXPERIMENTOS LLEVADOS A CABO CON EL TRÍMERO AL-470	142
Estudios de fluorescencia	143
Estudios de solubilidad y estabilidad química	146
CONCLUSIONES	148
PARTE EXPERIMENTAL	150
BIBLIOGRAFÍA	153
CONCLUSIONES GENERALES	155
MÉTODOS GENERALES	161

Solubility assay	164
Stability assay	164
BIOLOGICAL METHODS	164
Anti-HIV activity assay	164
Surface Plasmon Resonance Experiments assay	165
Antiviral activity against EV71	165
Time of addition experiment (TOA)	166
Thermo-stability assay	166
Fluorescent assay	166
BIBLIOGRAFÍA	167

Introducción General

La presente Tesis Doctoral se centra en una familia de dendrímeros de triptófano, descubierta en nuestro grupo de investigación, que muestra actividad dual frente al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y frente al Enterovirus 71 (EV71), dos virus muy diferentes entre sí, tanto en su ciclo replicativo como en su estructura. Antes de pasar a comentar el trabajo realizado, vamos a hacer una breve introducción sobre las características más significativas de ambos virus, así como de los inhibidores de su replicación descritos hasta el momento.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es el estadio clínico más avanzado de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Dicha infección provoca la destrucción progresiva del sistema inmune del cuerpo, y más en concreto de una subpoblación de linfocitos T, los CD4⁺. Como consecuencia se producen infección por gérmenes oportunistas, el desarrollo de tumores y la afectación neurológica que definen el SIDA.

De acuerdo con los datos publicados en 2016 por el programa de las Naciones Unidas (ONUSIDA),¹ el número de personas infectadas por VIH se estimaba en alrededor de 36.7 millones. Durante ese año se produjeron alrededor de 2.1 millones de nuevas infecciones y 1.1 millones de fallecimientos.

El VIH, agente etiológico del SIDA, es un retrovirus que se transmite principalmente por vía sexual y sanguínea así como por vía vertical (de madre a hijo).

En la actualidad se considera que los descubridores del VIH fueron Montagnier y Barré-Sinoussi y así se reconoció con la concesión del premio Nobel de medicina en 2008 a los dos investigadores franceses.² Hay que destacar que la metodología para la identificación de los retrovirus humanos en la que había estado trabajando en los años previos el grupo de Robert Gallo del NIH (National Institute of Health) de Bethesda en EEUU, fue determinante para identificar esta enfermedad.

Hasta el momento se han aislado dos subtipos del VIH capaces de producir SIDA y que se han denominado VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se encuentra diseminado por todos los continentes y es considerado el responsable de la epidemia mundial. Por otro lado, el VIH-2 es un virus endémico de África Oriental y es menos virulento e infectivo que el VIH-1. Ambos virus difieren en su secuencia genómica, propiedades antigénicas y tamaño de sus proteínas.^{3,4}

El material genético del VIH está constituido por ARN que debe ser copiado en ADN bicatenario para integrarse en el núcleo celular. Este proceso de conversión de ARN a ADN es la característica que define a los retrovirus. Se trata del proceso inverso al de la transcripción habitual y es llevado a cabo por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI).

Estructuralmente el VIH se compone de una envoltura lipídica y una nucleocápsida en cuyo interior se localiza el material genético y las enzimas necesarias para llevar a cabo el ciclo viral (Figura 1).

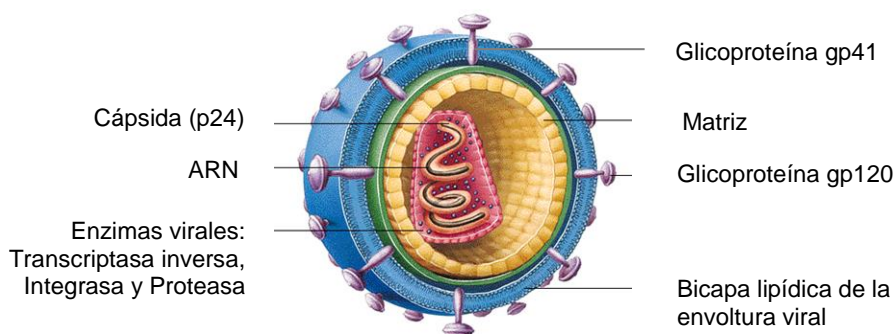


Figura 1. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

La envoltura consiste en una bicapa lipídica procedente de la célula infectada que contiene dos glicoproteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante otra glicoproteína, la gp41. Estas dos glicoproteínas son las responsables de la interacción y fusión del virus con la célula huésped. La nucleocápsida está formada por la proteína p24 y envuelve dos cadenas idénticas de ARN y las enzimas necesarias para su replicación: transcriptasa inversa (TI), integrasa y proteasa.

Existen dos tipos de células humanas que son blanco principal de la infección por VIH, los linfocitos T y los macrófagos. La entrada del VIH en la célula se produce por la interacción del virus con un receptor específico situado en la superficie celular denominado CD4 (proteína de transmembrana constituida por 433 aminoácidos). Esta molécula se expresa fundamentalmente en un subtipo de linfocitos T, los T colaboradores (helper). Posteriormente la glicoproteína gp120 interacciona con los co-receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 permitiendo que la glicoproteína viral gp41 se introduzca en la membrana celular favoreciendo así el proceso de fusión y la entrada del virus en la célula. A continuación, el virus se descapsida y se libera el genoma viral (en forma de ARN), el cual es convertido en ADN de doble cadena por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI). Este ADN viral penetra en el núcleo de la célula y se integra en el ADN celular en un proceso catalizado por la enzima viral integrasa. De este modo, la célula queda “programada” para crear nuevas copias del VIH. Los mecanismos celulares normales transcriben el ADN viral integrado en el material genético de la célula huésped, en nuevas moléculas de ARN viral y ARN mensajero viral, que a su vez dirige la síntesis de nuevas proteínas virales. Dichas proteínas una vez sintetizadas deben procesarse antes de ensamblarse en una partícula viral madura. Este proceso consiste en una ruptura proteolítica catalizada por la proteasa viral. Estas nuevas proteínas y el ARN viral se organizan en un nuevo virión que abandona el linfocito T, tomando un fragmento de membrana para utilizarlo como envoltura (Figura 2).⁵

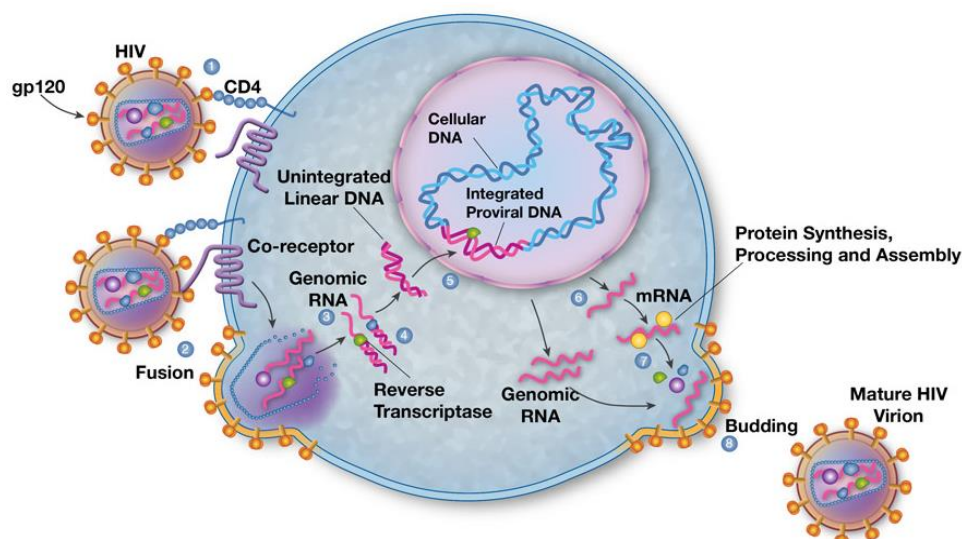


Figura 2. Ciclo replicativo del VIH

Desde la aparición de los primeros casos de SIDA, en la década de los 80, se ha trabajado intensamente tanto en la prevención como en la búsqueda de inhibidores de la replicación del VIH con el fin de desarrollar fármacos para el tratamiento de la enfermedad. De hecho, ésta es una de las áreas terapéuticas en las que más logros se han alcanzado en las últimas décadas.

En cuanto a los últimos logros obtenidos en la detección temprana de la enfermedad, hay que destacar un descubrimiento muy reciente (febrero 2017) patentado por investigadores del CSIC. Se trata de un biosensor capaz de detectar el VIH-1 en la primera semana después de la infección. Este biosensor detecta la proteína p24 presente en la nucleocápsida del virus en una concentración 100.000 veces menor que los métodos de detección en sangre disponibles hasta el momento. Además, el tiempo total del ensayo es de 4 horas y 45 minutos, por lo que los resultados clínicos se podrían obtener en el mismo día.⁶ La duración de la etapa entre el contagio y la seroconversión es de aproximadamente cuatro semanas, por lo que la detección temprana del VIH es crucial para la mejora de la salud del individuo. Este descubrimiento supone un avance para combatir la infección por VIH ya que disminuye el tiempo de detección del mismo y por ello se puede iniciar antes el tratamiento antirretroviral aumentando así el porcentaje de éxito contra la infección.

El desarrollo de fármacos para combatir el SIDA también ha sido asombroso si se tiene en cuenta que en los años 80 no se conocía ni siquiera cual era el agente etiológico de la enfermedad. En la actualidad existen alrededor de 30 tratamientos (fármacos y varias combinaciones de éstos) aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del SIDA.⁷ Dichos compuestos pueden clasificarse en cinco grandes grupos (Tabla 1):

1. Inhibidores del proceso de entrada/fusión.
2. Nucleósidos/Nucleótidos inhibidores de la enzima viral transcriptasa inversa (TI).
3. Inhibidores alostéricos de la TI.
4. Inhibidores de la enzima viral proteasa.
5. Inhibidores de la enzima viral integrasa.

Tabla 1. Fármacos anti-VIH aprobados para el tratamiento del SIDA en la actualidad

Familia farmacológica		Fármacos	
Inhibidores de Transcriptasa Inversa	Nucleósidos	Zidovudina (AZT) Didanosina (ddI) Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T) Abacavir (ABC) Emtricitabina (FTC)
	Nucleótidos	Tenofovir (TNV)	
	Alostéricos	Nevirapina (NVP) Delavirdina (DLV) Efavirenz (EFV) Etravirina Ralpivirina	
Inhibidores de Proteasa		Saquinavir (SQV) Indinavir (IDV) Ritonavir (RTV) Nelfinavir (NFV)	Atazanavir (AZV) Tipranavir (TPV) Fosamprenavir Darunavir
Inhibidores de Integrasa		Raltegravir Dolutegravir	
Inhibidores de entrada / fusión		Enfuvirtide (ENV; T-20) Maraviroc	

Estos fármacos se prescriben en combinación, en lo que se ha denominado Terapia Antirretroviral de Gran Eficacia (TARGA, HAART en inglés). Esta terapia ha ido evolucionando a lo largo de los años desde un régimen de más de 20 píldoras al día, a una única píldora diaria. Entre las combinaciones destaca la conocida comercialmente como Atripla[®], una combinación de emtricitabina, tenofovir y efavirenz. También existen otras formulaciones triples como Truvada[®], así como distintas combinaciones de fármacos que varían en función de la evolución de la enfermedad.⁸

La implantación de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA) ha cambiado radicalmente el curso del SIDA, que ha pasado de ser una enfermedad mortal a crónica.⁹ Este tipo de terapia no sólo mantiene bajo control la infección por el VIH en los pacientes seropositivos, sino que también reduce el riesgo de transmitir el virus a otras personas. Sin

embargo, en contra de lo que afirmaron algunos investigadores como David Ho en 1996, la terapia TARGA no es capaz de eliminar el virus del organismo por muchos años de tratamiento que siguiera un individuo seropositivo. Esto se debe a lo que se conoce como “células dormidas”, que son las que mantienen el virus inactivo en sus cromosomas, escondiéndose en reservorios y escapando de la acción de los antiretrovirales. Acabar con estos reservorios y despertar a las células dormidas es el objetivo de diversas estrategias que se están desarrollando en la actualidad, tales como la terapia génica, la intensificación farmacológica o determinados tratamientos combinados que buscan añadir a la terapia TARGA un anticanceroso encargado de activar los reservorios de VIH. Dentro de esta línea de investigación, destaca el trabajo que está realizando el investigador de la Universidad de Carolina del Norte, David Margolis, que está probando en humanos una combinación de la terapia TARGA con un inhibidor de la histona desacetilasa llamado SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) que ha sido aprobado para el tratamiento del linfoma cutáneo de las células T y es capaz de activar el provirus del VIH-1 en un sistema de células modelo.¹⁰

Aunque la terapia TARGA ha supuesto un hito importante en la lucha contra el SIDA, no está exenta de problemas. Así por ejemplo, ya han aparecido virus resistentes a la mayoría de los agentes antiretrovirales de los que se dispone, lo que lleva a una menor efectividad de los mismos. Estos virus resistentes pueden ser transmitidos a otros individuos haciendo más complejo su tratamiento.¹¹

Además, la toxicidad asociada a todos estos fármacos conduce a graves problemas secundarios como lipodistrofia, intolerancia a la glucosa, altos niveles de colesterol y problemas cardiovasculares, entre otros. Por todo ello, existe la urgente necesidad de encontrar nuevos fármacos con menos efectos secundarios y que actúen frente a nuevas dianas virales o frente a las ya disponibles, mediante mecanismos de acción diferentes.

Aunque como se ha comentado, en los países desarrollados las terapias combinadas han conseguido transformar el SIDA en una enfermedad crónica, la situación es muy diferente en los países en vías de desarrollo, donde el acceso al arsenal de fármacos antirretrovirales se ve limitado, unas veces por su alto coste y otras por las trabas burocráticas que hacen que los tratamientos se demoren más de un año. Por ello, la solución en estos países sería encontrar un método de prevención barato y asequible económicamente como son los geles o cremas microbicidas, que persiguen inactivar al virus en el lumen vaginal antes de que pueda entrar en contacto con los linfocitos T4. De este modo, los geles microbicidas podrían ser aplicados tópicamente por las mujeres, con anterioridad al contacto sexual, para prevenir la infección por VIH.

Los primeros microbicidas (PRO2000, BufferGel, etc) llevaban en su composición un inhibidor de la entrada viral, no obstante, los ensayos realizados mostraron que la presencia de este tipo de inhibidor no es suficiente para prevenir la infección.¹² Por ello, en la actualidad se están buscando microbicidas que impidan la entrada del virus en la célula huésped y además

inhiban la infección en el caso de que el virus consiga penetrar en la célula. En este sentido, en el Centro para el Programa de Investigación del Sida en Sudáfrica (CAPRISA, en sus siglas en inglés), nacido con el fin de promover la prevención y la investigación en VIH, se está trabajando con un microbicida combinado que posee entre uno de sus componentes tenofovir, un inhibidor de la Transcriptasa Inversa.¹³

Otro microbicida en estudio, desarrollado por el grupo de investigación español BIOINDEN, posee como principio activo un dendrímero capaz de bloquear la infección por VIH en células epiteliales y en el sistema inmune. Tras completar con éxito los ensayos *in vitro*, así como las pruebas de tolerancia y toxicidad, se ha demostrado que dicho microbicida no es tóxico y ofrece protección frente al VIH durante 18–24 horas.¹⁴

Dado el interés que existe en la actualidad en la inhibición del proceso de entrada/fusión, en la presente memoria nos hemos centrado en dicho proceso como diana terapéutica para conseguir fármacos anti-VIH eficaces. Prueba del interés en la inhibición de esta etapa fue la aprobación de enfuvirtide y maraviroc,¹⁵ dos inhibidores del proceso de entrada/fusión incorporados en 2003 y 2007, respectivamente, al arsenal terapéutico para el tratamiento del SIDA. A continuación comentaremos las características más importantes de dicho proceso.

Entrada/fusión del VIH: una diana prometedora en el tratamiento anti-VIH

Bloquear la entrada del virus en la célula e impedir así la infección es una de las estrategias más atractivas para inhibir la replicación del VIH. Sin embargo, la complejidad del proceso, como se ilustra a continuación, explica por qué los éxitos en este área han sido menores que los alcanzados frente a las enzimas virales (transcriptasa inversa, integrasa y proteasa).

Una de las fases del proceso de infección comienza en las mucosas externas, donde se expresan las células dendríticas intersticiales. Los carbohidratos presentes en la superficie de la glicoproteína viral gp120 son reconocidos a través de la proteína DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin) presente en las células dendríticas y en los macrófagos (Figura 3).¹⁶ DC-SIGN ayuda a la internalización del VIH en los órganos linfoides y a su presentación a las células T CD4⁺.^{17,18}

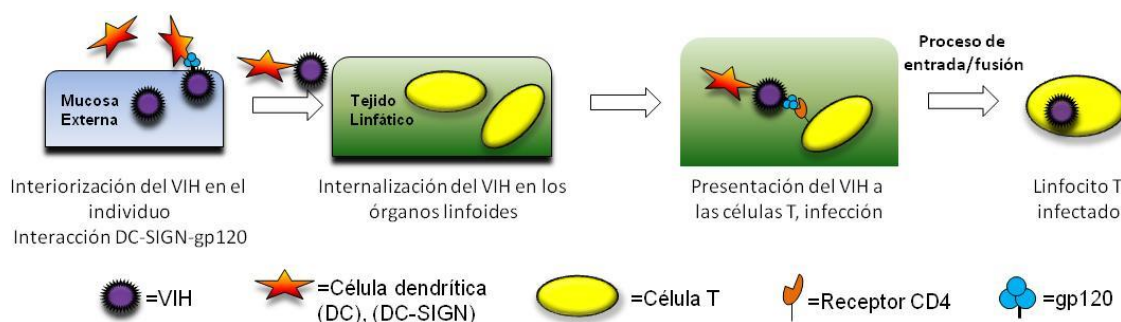


Figura 3. Proceso de llegada del VIH a los linfocitos T

A continuación tiene lugar la entrada del virus en la célula-T mediante un proceso complejo que puede dividirse en tres etapas (Figura 4): a) reconocimiento, b) unión a los co-receptores celulares, y c) fusión.

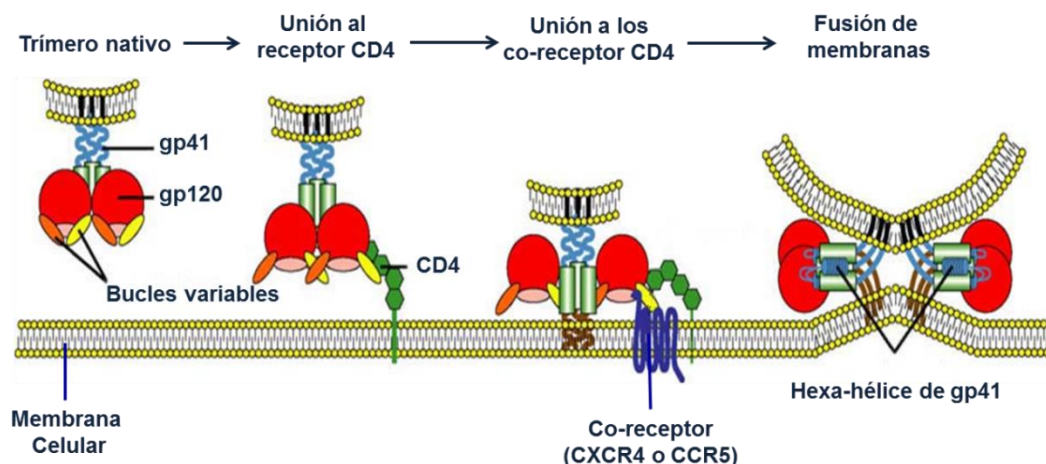


Figura 4. Proceso de entrada/fusión

En la etapa de reconocimiento tiene lugar la interacción de la glicoproteína viral gp120 con el receptor celular CD4. Tras la interacción con el receptor CD4, la glicoproteína gp120 experimenta una serie de cambios conformacionales quedando expuestas las regiones variables V1, V2 y V3, siendo la región V3 la que está especialmente implicada en la posterior interacción con los co-receptores celulares CCR5 y CXCR4. Esta región V3, de 35 residuos de longitud, es muy variable, se encuentra altamente glicosilada y su secuencia de aminoácidos determina la unión del virus a los co-receptores CCR5 o CXCR4. La unión de la gp120 a estos co-receptores provoca cambios conformacionales en el complejo glicoprotéico gp120/gp41 que dejan expuesto el dominio hidrófobo de fusión de la gp41 el cual se inserta en la membrana celular permitiendo la creación de poros en ella (fusión) y posibilitando la entrada del contenido viral en el citoplasma.

Los inhibidores del proceso de entrada/fusión se clasifican en función de la diana terapéutica hacia la que van dirigidos.¹⁹

Entre dichos inhibidores se encuentran:

1. Inhibidores de la unión virus-DC-SIGN
2. Inhibidores de la unión virus-célula T
 - a. Inhibidores de uniones inespecíficas
 - b. Inhibidores de la unión gp120-CD4
 - c. Reguladores de la expresión del receptor celular CD4
3. Inhibidores de la unión a los co-receptores celulares
 - a. Inhibidores de CCR5
 - b. Inhibidores de CXCR4

4. Inhibidores de la fusión (Inhibidores de la glicoproteína viral gp41)

Dentro del grupo de los inhibidores del proceso de entrada/fusión el primer fármaco aprobado por la FDA fue enfuvirtide (Fuzeón[®], ENV, T-20), un péptido de 36 aminoácidos capaz de interactuar con la glicoproteína viral gp41 bloqueando el proceso de fusión de las membranas viral y celular. Sin embargo, su naturaleza peptídica y su inestabilidad no permiten su administración por vía oral y debe ser inyectado dos veces al día, lo que limita su aplicación.²⁰ El segundo fármaco aprobado fue maraviroc, desarrollado por la farmacéutica Pfizer (Figura 5), que actúa bloqueando el co-receptor celular CCR5, impidiendo así la unión con el complejo gp120-CD4.²¹ La mayor ventaja de este tipo de compuestos respecto al resto de medicamentos antirretrovirales es que actúan fuera de los linfocitos T, antes de que el VIH entre en la célula.

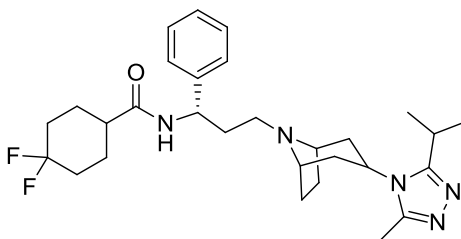


Figura 5. Estructura de maraviroc (Pfizer)

Además del complejo proceso de reconocimiento entre el VIH y las células T, se producen otros procesos menos específicos de adsorción y unión entre el VIH y la membrana celular. Dichos procesos tienen lugar a través de interacciones iónicas (carga-carga) entre regiones de la gp120 que poseen múltiples aminoácidos de carácter básico (cargadas positivamente) y regiones polianiónicas (cargadas negativamente) de la célula huésped. Por tanto, no resulta sorprendente el hecho de que existan un gran número de polisacáridos de naturaleza aniónica, de origen natural y sintético, que muestran actividad anti-VIH al interactuar con las regiones básicas de la gp120 impidiendo su interacción con las células CD4. Entre ellos se encuentran polianiones solubles como el sulfato de dextrano, la sulfato ciclodextrina o la heparina.^{22,23,24} En concreto, el sulfato de dextrano^{25,26} (Figura 6), un polisacárido de D-glucosa con propiedades anticoagulantes descubierto en 1987, mostró actividad frente a VIH debido a su unión con la cubierta de las células CD4. Una de las desventajas del sulfato de dextrano como inhibidor del VIH es su elevado peso molecular, que varía entre 5000 y 500.000 Da, así como su elevado grado de polidispersidad. Asimismo, se ha demostrado que existen enzimas que reconocen y degradan este tipo de moléculas eliminando los grupos sulfato o sulfonato con la consiguiente pérdida de actividad.

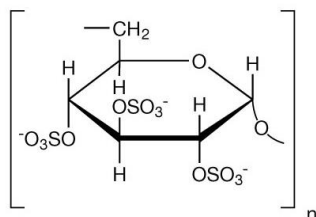


Figura 6. Estructura de sulfato de dextrano

También se ha descubierto que la suramina, una naftilurea polisulfonada (Figura 7), inhibe la replicación del VIH mediante la interacción con la región V3 (con gran cantidad de aminoácidos básicos) de la glicoproteína gp120 impidiendo así la unión del VIH con la célula huésped.²⁷

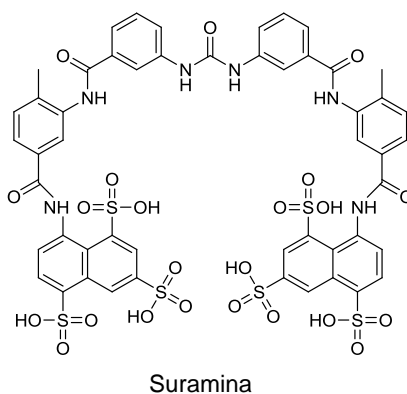


Figura 7. Estructura de la suramina

La glicoproteína gp120 como diana terapéutica

Tal y como se ha comentado, la envoltura del VIH consiste en una bicapa lipídica que contiene dos glicoproteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante la proteína gp41 (Figura 8).

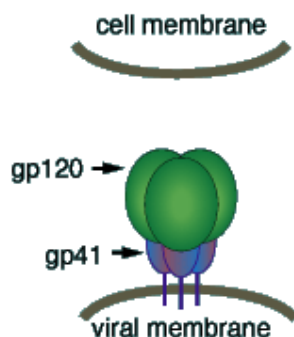


Figura 8. Complejo gp120-gp41

La gp120 ocupa un lugar preferente en la infección por VIH por ser el primer punto de contacto con la célula huésped. Debido a ello, en la actualidad se están realizando muchos esfuerzos para desarrollar compuestos que interaccionen específicamente con dicha glicoproteína impidiendo así la interacción con el receptor celular.

Existen diferentes aproximaciones para tratar de inhibir dicha interacción. Entre ellas, destacaremos en primer lugar la desarrollada por la compañía farmacéutica Bristol Meyers Squib que mediante cribado de alto rendimiento descubrió el compuesto BMS-488043 (Figura 9). Dicho compuesto demostró actividad antirretroviral en pacientes infectados con VIH tras administración oral pero su desarrollo fue abandonado debido a su pobre farmacocinética.²⁸

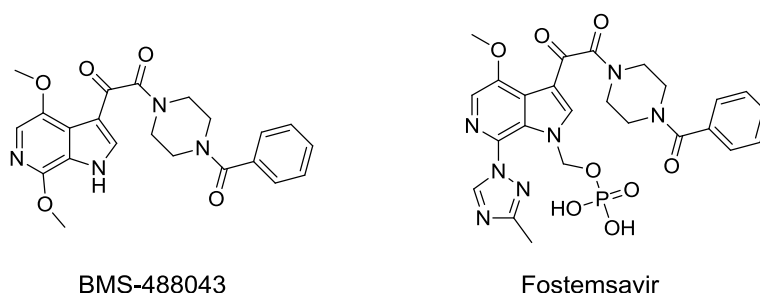


Figura 9. Estructura de los compuestos BMS que evitan la interacción gp120-CD4

A partir del BMS-488043 y tras un estudio de relaciones estructura-actividad, se llegó al compuesto fostemsavir (Figura 9) que en la actualidad pertenece a la compañía GlaxoSmithKline (GSK) y se encuentra en fase clínica III.^{29,9}

También la compañía Pfizer Global Research inició en 2009 una línea de investigación centrada en la glicoproteína gp120 dentro de la cual encontró una nueva familia de inhibidores de la entrada cuyo prototipo es el compuesto representado en la Figura 10. Este compuesto y los derivados resultantes de las modificaciones en el fragmento de metoxipiridina actúan inhibiendo la primera etapa del proceso de entrada ya que se unen directamente a la superficie de la glicoproteína viral gp120 evitando que ésta pueda interaccionar con el receptor celular CD4 de la célula huésped.

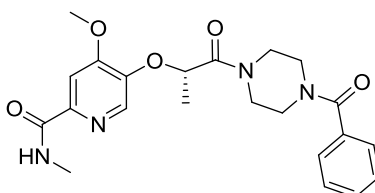


Figura 10. Estructura del compuesto desarrollado por la compañía Pfizer

Otra de las estrategias dirigidas a interaccionar con la glicoproteína gp120 se ha centrado en los dendrímeros, moléculas altamente ramificadas con un tamaño uniforme y controlado y con elevada densidad de grupos funcionales en la periferia. En la actualidad este

tipo de compuestos está siendo empleado para la encapsulación de fármacos, preparación de profármacos y/o modificación en la periferia con los grupos funcionales adecuados para facilitar su unión a distintos tipos de moléculas y/o superficies.

Entre los dendrímeros dirigidos a la glicoproteína viral gp120 se encuentran los polianiónicos (con 32 grupos carboxílicos ó 24 naftodisulfónicos en la periferia) que deben su eficacia a la interacción con residuos básicos presentes en dicha glicoproteína.³⁰

Recientemente, se han descrito otros dendrímeros polianiónicos con átomos de silicio en su núcleo central y diferentes grupos ácidos (carboxilatos, sulfatos, sulfonatos...) en la periferia.³¹ El modo de acción de estos dendrímeros está asociado a las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de la periferia con la glicoproteína gp120. También se ha observado que ejercen interacciones con algunos receptores presentes en la célula huésped (CD4, CXCR4 y CCR5).

Por otra parte, se han preparado dendrímeros dirigidos a inhibir la interacción gp120/DC-SIGN. Dichos compuestos, que poseen residuos de manosa o fucosa en la periferia (16–32 residuos), son capaces de interaccionar con la proteína celular DC-SIGN, presente en la superficie de las células dendríticas, ya que dicha proteína interacciona con azúcares, especialmente manosa. De esta forma se evita la interacción de la proteína DC-SIGN con la glicoproteína viral gp120 y en consecuencia la entrada del VIH en la célula huésped.³²

Los carbohidratos de la glicoproteína gp120 como diana terapéutica

La glicoproteína viral gp120 está densamente glicosilada, aproximadamente el 50% de los 120 KDa de su peso molecular se debe a la presencia de carbohidratos. Es importante señalar que los carbohidratos de la cubierta viral son sintetizados por el huésped ya que el VIH no posee la maquinaria capaz de producir sus propios carbohidratos.³³ La presencia de carbohidratos en la superficie viral afecta a numerosos eventos que tienen lugar durante el ciclo replicativo del VIH, entre ellos la interacción con el receptor celular CD4.³⁴ Estos oligosacáridos siempre se unen a la proteína a través de residuos de Asparagina mediante N-glicosidación, no observándose en ningún caso O-glicosidación.³⁵

Las 24 posibles posiciones de N-glicosilación están ocupadas por oligosacáridos en los que está presente una estructura común de pentasacárido (A, Figura 11) a la que se unen distintos azúcares para dar lugar a tres tipos de oligosacáridos: con alto contenido en manosa (high mannose), complejos e híbridos.

Los oligosacáridos de alto contenido en manosa, tienen hasta otros 6 residuos de manosa unidos a las distintas ramas de la estructura básica tal y como se observa en la Figura 11. En las estructuras complejas podemos encontrar otros azúcares diferentes de manosa, entre ellos: galactosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina y L-fucosa. En las

estructuras híbridas se encuentran elementos estructurales comunes a los dos tipos de oligosacáridos anteriores.

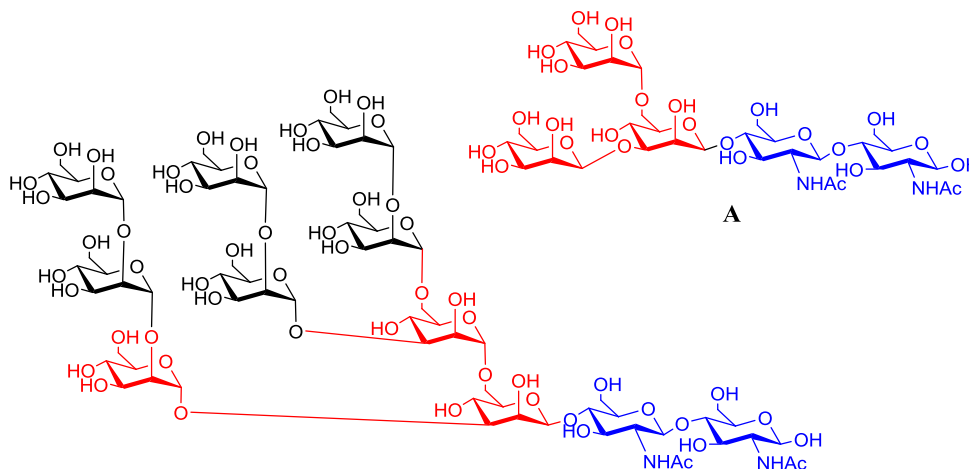


Figura 11. Estructura química del fragmento básico de pentasacárido A y un oligosacárido con alto contenido en manosa.

Los azúcares de la glicoproteína gp120 actúan como “escudo protector” enmascarando los epítomos inmunogénicos (dianas para el ataque de los anticuerpos) lo que permite al virus burlar la respuesta inmune de los organismos a los que infecta.³⁶

Como veremos en el apartado de antecedentes, desde el año 2006 nuestro grupo de investigación se ha centrado en la glicoproteína viral gp120, y más concretamente en los carbohidratos presentes en ella, para el desarrollo de compuestos (“lectinas artificiales”) con actividad frente al VIH. Esta aproximación es bastante novedosa ya que, únicamente, existe un ejemplo en la literatura de un polímero funcionalizado con benzoboroxoles que posee una elevada afinidad por los carbohidratos de la gp120. Actualmente dicho compuesto está en fase de estudio como microbicida.³⁷

El Enterovirus 71 (EV71)

El Enterovirus 71 pertenece a la familia *Picornaviridae* (“pico” indica pequeño, y “rna” alude a que su material genético es ARN), una de las familias de virus más antigua y diversificada. Dicha familia consta de cuatro géneros, dos de ellos afectan únicamente a animales (*Cardiovirus* y *Aphthovirus*); y los otros dos (*Rinovirus* y *Enterovirus*) afectan al hombre aunque también existen serotipos que infectan a animales.

El EV71 se aisló por primera vez en 1969 en California, en pacientes que presentaban enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. Desde entonces, han tenido lugar diversas epidemias causadas por EV71 en todo el mundo.^{38,39} Durante las últimas dos décadas el virus ha afectado de manera especial al área Asia-Pacífico (Taiwán, China) convirtiéndose en un problema de salud pública importante en diversos países de esta zona. Además, en los

últimos años se han detectado varios casos en Europa. Entre ellos, un brote de enterovirus registrado en 2016 en España, que afectó a más de 73 niños, entre los que hubo complicaciones neurológicas de diferente naturaleza e incluso un fallecido.^{40,41} Actualmente no existe ningún fármaco en el mercado que pueda prevenir o tratar los síntomas ocasionados por enterovirus, lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de buscar nuevos fármacos eficaces para inhibir la replicación de este tipo de virus y en particular del EV71.

El EV71 se transmite vía fecal-oral y la infección por EV71 es una de las causas más comunes del síndrome de mano, pie y boca en niños. Aunque la replicación del virus se focaliza fundamentalmente en el tracto gastro-intestinal, también es capaz de alcanzar el sistema nervioso central, causando síndromes neurológicos graves, tales como meningitis aséptica, encefalitis, parálisis similar a la producida por el virus de la polio e incluso la muerte, siendo los niños de corta edad especialmente vulnerables a la infección por el mismo. En estos momentos en los que la erradicación de la polio está a punto de alcanzarse, el EV71 supone una nueva amenaza para la salud pública sobre todo en aquellos países en los que se han registrado brotes importantes de la infección en los últimos años.

Los picornavirus, y entre ellos el EV71, miden alrededor de 30 nm y presentan su material genético como una única cadena de ARN positivo rodeado de una cápsida que carece de envoltura. Dicha cápsida posee una simetría de tipo icosaédrico con 60 caras organizadas en 12 pentámeros. A su vez, cada pentámero contiene un eje de simetría central alrededor del cual se sitúan las proteínas VP1-VP3 de la cubierta, quedando la proteína VP4 hacia el interior, la cual está unida al extremo 3' de la cadena de ARN(+) (Figura 12). El otro extremo de la cadena de ARN viral (extremo 5') se encuentra covalentemente unido a la proteína viral VPg que es usada como cebador y es reconocida por la enzima ARN polimerasa para iniciar la etapa de replicación.

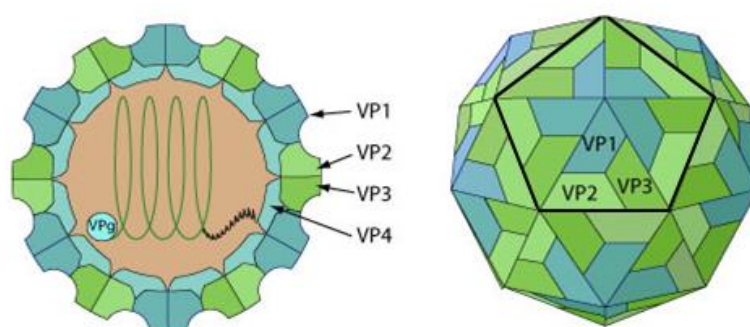


Figura 12. Estructura de la cápsida de EV71

La estructura cristalina del EV71 maduro⁴² reveló la existencia en cada unidad icosaédrica, de una región en el eje central (five-fold axis) (Figura 13) con carga positiva y muy expuesta al medio (color azul). Varios estudios indican que dicha región juega un papel importante en la unión al receptor celular.⁴³

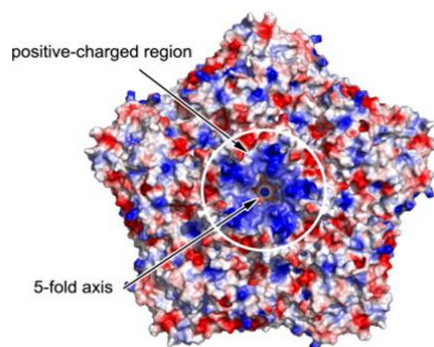


Figura 13. Superficie de potencial electrostático de una unidad icosaédrica de EV71

La replicación del EV71 (Figura 14) tiene lugar en su totalidad en el citoplasma de la célula huésped y consta de las siguientes etapas:

a) Entrada del virus en la célula. La infección comienza cuando el virus se une a receptores específicos situados en la superficie de la célula huésped. El sitio de unión al receptor parece ser un bolsillo hidrófobo que se encuentra en el interior de la proteína VP1 de la cápsida viral.⁴⁴

Hasta el momento se han identificado dos glicoproteínas de membrana SCARB2 (scavenger receptor B2) y PSGL-1 (human P-selectin glycoprotein ligand-1) como receptores celulares para EV71. La proteína SCARB2 se expresa en una gran variedad de tejidos y células, mientras que la distribución de PSGL-1 está limitada a células del sistema inmunitario como leucocitos y células dendríticas.⁴⁵ Por el momento se desconoce el papel que desempeñan ambos receptores en la célula aunque se sabe que son proteínas de membrana altamente glicosiladas.⁴⁶

Una vez unido al receptor celular, la cápsida viral se desestabiliza y la proteína viral VP4 que lleva unido el ARN viral se libera de la cápsida y conduce al ARN al interior de la célula.

b) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína precursora. El ARN(+) viral sirve de molde tanto para la traducción a proteínas como para la replicación. En primer lugar, el ARN se dirige a los ribosomas para ser traducido. El resultado de la traducción es una única poliproteína que se escinde en un paso posterior de maduración por la acción de las proteasas virales 2A y 3C (2A^{pro} y 3C^{pro}) dando lugar a las proteínas virales que se requieren para la replicación y el empaquetamiento viral.⁴⁶

c) Replicación del genoma. Para la replicación del ARN viral se forman vesículas dentro de la célula donde la proteína VPg, unida al extremo 5' de la cadena de ARN(+), es reconocida por la ARN polimerasa viral (3D^{pol} o RdRp) para generar la copia de ARN(-) que posteriormente vuelve a ser copiado para dar el ARN(+) de las nuevas partículas virales.

d) Encapsidación. Las proteínas estructurales (VP1, VP3 y VP0) resultantes del procesamiento de la poliproteína viral se unen para formar un virus inmaduro que experimenta un proceso de maduración, consistente en la escisión de la proteína VP0 en otras dos (VP2 y VP4).

e) Libерación de los viriones maduros. Por último, los viriones maduros salen al exterior mediante la destrucción de la célula huésped (ciclo lítico).

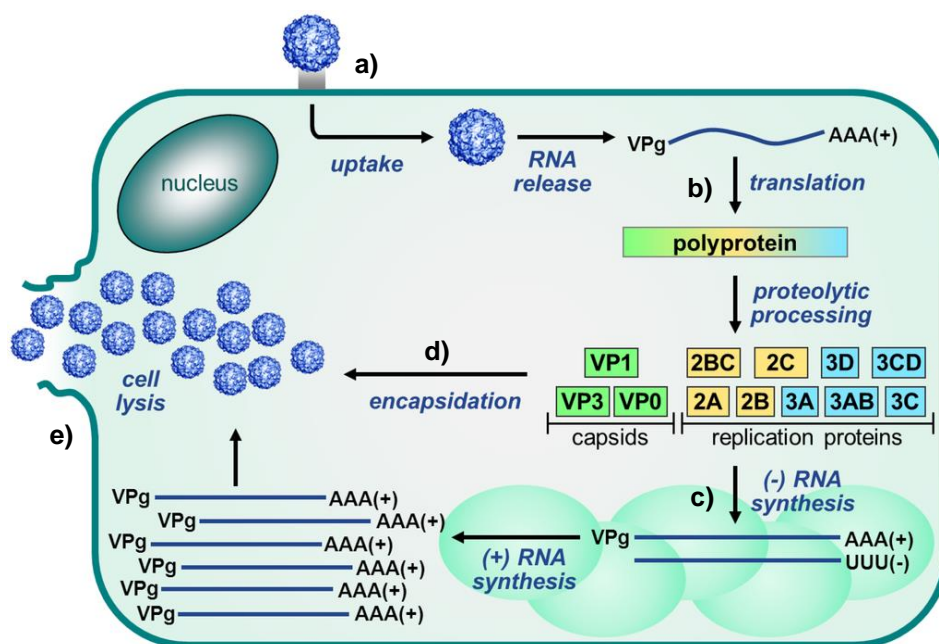


Figura 14. Ciclo replicativo del EV71

En principio, cualquiera de las fases del ciclo replicativo del EV71 supone una diana potencial para el desarrollo de compuestos capaces de frenar la replicación viral.⁴⁷ Desde el punto de vista de la diana sobre la que actúan, dichos compuestos se han clasificado en los siguientes grupos:

➤ Inhibidores de la entrada

Varios antivirales originalmente desarrollados para inhibir el proceso de entrada del rinovirus se han ensayado frente a EV71 debido a la similitud en el ciclo replicativo de ambos virus. Entre ellos se encuentra el pleconaril⁴⁸ (Figura 15), un fármaco que ha demostrado actividad antiviral frente a rinovirus y frente a distintos tipos de enterovirus, entre ellos EV71. Sin embargo, la efectividad del compuesto varía en función de la cepa viral, resultando, por ejemplo, ineficaz frente a la replicación de la cepa de EV71 responsable de la epidemia en Taiwán.

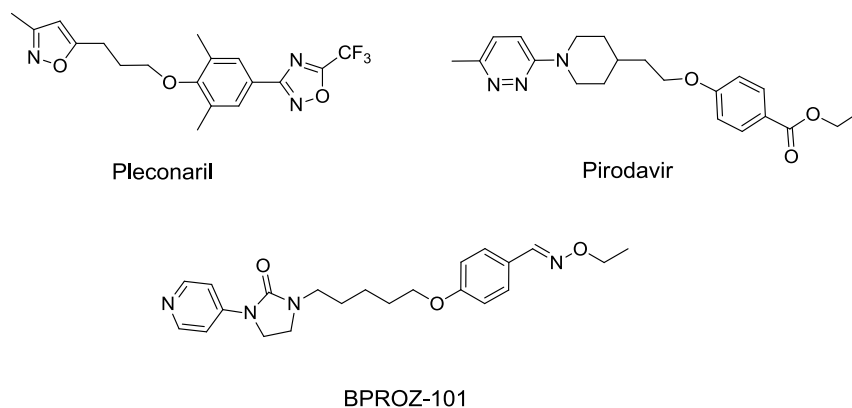


Figura 15. Estructuras de algunos inhibidores de entrada tipo WIN

A partir del pleconaril y de sus análogos, denominados WIN, se generó una librería virtual de compuestos cuyas conformaciones de mínima energía encajan en el bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1. A partir de ellos y mediante modificación química, se llegó a una nueva familia de piridilimidazolidinonas que presentaron actividad muy prometedora frente a EV71, dentro de la que se encuentra el compuesto BPROZ-101.³⁹ Otro compuesto tipo WIN que merece la pena destacar es el pirodavir⁴⁹ (Figura 15), un análogo del pleconaril desarrollado por la compañía Janssen, que muestra actividad nanomolar frente a rinovirus y submicromolar frente a enterovirus.

Mediante estudios de docking y de rayos X, se ha observado que estos compuestos son capaces de unirse al bolsillo hidrófobo presente en la proteína estructural VP1 (Figura 16). Los compuestos WIN interaccionan con el bolsillo hidrófobo aumentando la estabilidad de la cápsida viral e impidiendo así la apertura de dicha cápsida y la posterior entrada del ARN viral en la célula huésped.⁵⁰

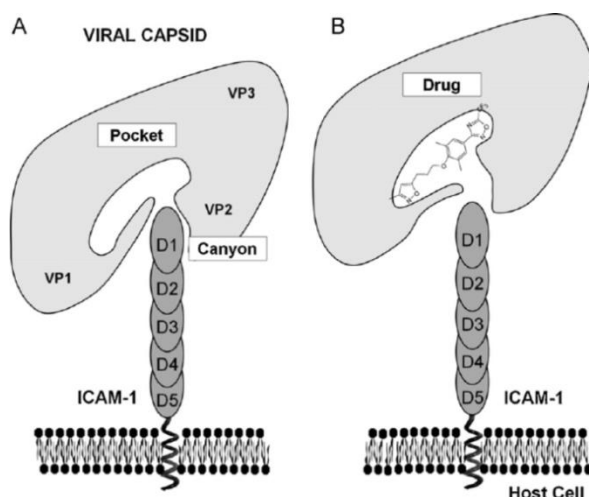


Figura 16. (A) Bolsillo hidrófobo de la proteína VP1 vacío. (B) Bolsillo hidrófobo de la proteína VP1 con pleconaril en su interior

Otro tipo de inhibidor de la entrada es la suramina⁵¹ (Figura 17), una naftilurea polisulfonada capaz de bloquear la proliferación de EV71 mediante la unión a la cápsida viral, fuera del bolsillo hidrófobo. Aunque de momento su mecanismo de inhibición es desconocido, se cree que interacciona con la región de carga positiva de la cápsida a través de los 6 residuos sulfonato (SO_3^-) cargados negativamente presentes en su estructura. Posteriores estudios de resistencia llevados a cabo con el compuesto NF449 (Figura 17), un análogo de la suramina, revelaron la presencia de mutaciones en la proteína estructural VP1, lo que sugiere que esta proteína puede ser el punto de unión de este tipo de compuestos.⁵²

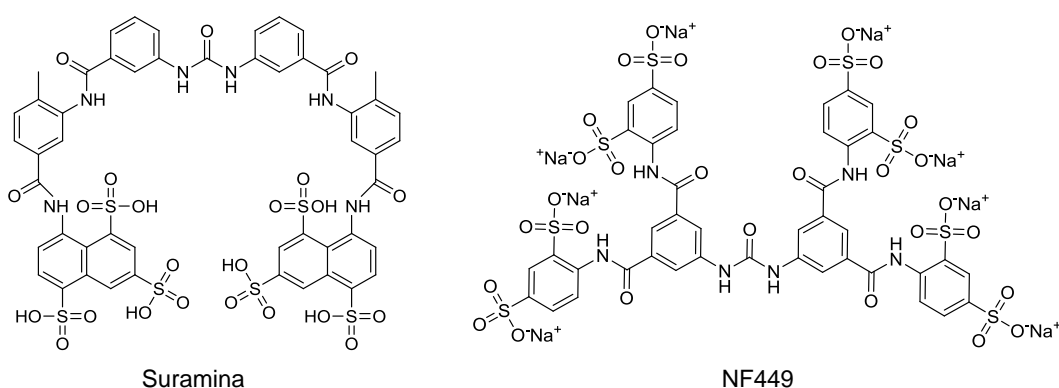


Figura 17. Estructura de la suramina y su análogo NF449

En la actualidad el desarrollo de compuestos capaces de unirse a la proteína VP1 de la cápsida viral se considera una estrategia muy prometedora para la búsqueda de inhibidores de EV71 ya que, como hemos dicho anteriormente, dicha proteína desempeña un papel crucial en la unión del virus a los receptores celulares.

➤ Inhibidores de las proteasas 3C^{pro} y 2A^{pro}

La lista de compuestos que actúan como inhibidores de las proteasas 3C^{pro} y 2A^{pro} del EV71 abarca derivados peptídicos y peptidomiméticos como rupintrivir, un fármaco desarrollado por Pfizer (Figura 18).^{53,54} Muchos de estos compuestos fueron desarrollados inicialmente como inhibidores de las proteasas del rinovirus⁵⁵ y posteriormente se descubrió que también inhibían las proteasas del EV71.⁵⁶

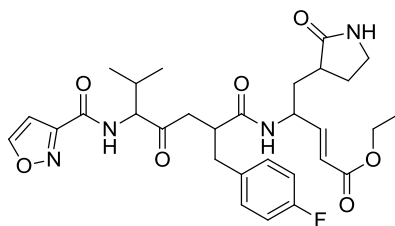


Figura 18. Estructura de rupintrivir

En la actualidad, la información obtenida a partir de los rayos X de la estructura cristalina de 2A^{pro} y de 3C^{pro} está siendo de gran utilidad para el diseño racional de inhibidores de dichas proteasas virales.^{57,58}

Un dato que merece la pena destacar es que a diferencia de las proteasas de otros virus, la proteasa 2A^{pro} del EV71 es capaz de escindir tanto la poliproteína viral como el factor eIF4GI (eukaryotic initiation factor 4G), implicado en el proceso de traducción de la célula huésped, sin que la traducción de ARN viral se vea afectada.⁵⁹ Por ello, los antivirales dirigidos hacia las proteasas de EV71 no sólo deberían bloquear la maduración de la poliproteína viral, sino que también deberían proteger a las proteínas del huésped, tales como eIF4GI, de la degradación por parte de las proteasas virales.

➤ Inhibidores de la RNA polimerasa

La maquinaria de replicación del EV71 es compleja. Si bien el papel fundamental lo desempeña la proteína viral 3D^{pol}, con una función ARN polimerasa-ARN dependiente, existen otras proteínas virales (2A-2C y 3A-3D 2C) y péptidos (VPg) que intervienen en el proceso de replicación y que ayudan a ensamblar el complejo de replicación en la superficie de las membranas vesiculares.⁶⁰ Dada la complejidad del proceso, no es de extrañar que los inhibidores de replicación pertenezcan a familias químicas muy variadas y que en muchos casos no se conozca cual es la proteína o proteínas sobre las que actúan. En 2010, se encontró que el ácido aurintricarboxílico (ATA)⁶¹ (Figura 19), un conocido inhibidor del proceso de adsorción del VIH que impide la interacción de la glicoproteína viral gp120 con su receptor celular CD4, inhibe la replicación de EV71 mediante la inhibición de la polimerasa 3D^{pol}.

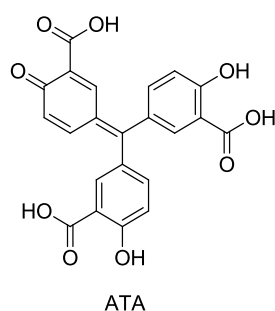


Figura 19. Inhibidor de RNA polimerasa

Los rayos X de la estructura cristalina de 3D^{pol} revelaron que dicha enzima adopta una conformación de “mano derecha-cerrada”, que se compone de dominios denominados “dedos”, “palma” y “pulgar”, similares a los que se encuentran en la transcriptasa inversa del VIH. Este hecho está siendo aprovechado para el diseño de inhibidores.

Finalmente, debido a que el ARN genómico del EV71 es sintetizado por su proteína viral 3D^{pol} (ARN polimerasa dependiente de ARN), y dicha enzima carece de función “correctora de pruebas”, el genoma viral presenta una alta tasa de mutaciones. Por ello, es muy probable que

durante el tratamiento antiviral se seleccionen variantes de EV71 que presenten fenotipos con resistencia a antivirales. Para hacer frente a este problema, el modelo de terapia combinada, empleada con éxito para el VIH, es un ejemplo a seguir. En el caso de EV71, al igual que en otras terapias combinadas, las moléculas elegidas para la combinación deben actuar a través de diferentes mecanismos. Por el momento se han encontrado varias combinaciones exitosas, entre ellas: IFN- α con rupintrivir⁶² (un inhibidor de la proteasa 3C^{pro} del EV71) o vapendavir (un inhibidor de entrada)⁶³ con rupintrivir.^{64,65}

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES

En el año 2006, nuestro grupo de investigación inició un proyecto cuyo objetivo final era la obtención de compuestos para el tratamiento de las enfermedades causadas por virus con cubierta glicosilada, con especial énfasis en el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Para ello se siguió una aproximación novedosa consistente en la búsqueda de moléculas pequeñas capaces de interactuar con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 de la cubierta del VIH mediante un mecanismo similar al de las lectinas o la pradimicina.

Las lectinas son proteínas presentes en la mayoría de seres vivos, desde virus o bacterias hasta plantas y animales que tienen la capacidad de interactuar con carbohidratos (mono- y oligosacáridos) de forma no covalente.^{66,67,68} Algunas de estas lectinas, más concretamente las que poseen especificidad por manosa o *N*-acetilglucosamina, muestran actividad antiviral, en particular frente a la replicación del (VIH).⁶⁹ Dicha acción antiviral se debe a la unión de estas lectinas a los azúcares presentes en la glicoproteína gp120 de la cubierta viral. Aunque el mecanismo exacto no se conoce todavía, es probable que esta unión afecte a la movilidad de los oligosacáridos de gp120 impidiendo de algún modo los cambios conformacionales que son necesarios para que la glicoproteína interactúe con los receptores celulares y el virus entre en la célula huésped.

Una observación muy interesante es que, ante la presión de determinadas lectinas, el VIH desarrolla mutaciones cuyo resultado es la eliminación/modificación de los sitios de *N*-glicosilación situados en la glicoproteína gp120 pero no en los de la glicoproteína gp41 (Figura 20).⁷⁰ En este caso, la aparición de cepas virales mutadas, contrariamente a lo que ocurre en las terapias antivirales convencionales, lejos de suponer un hecho perjudicial podría suponer un beneficio, ya que los epítomos inmunogénicos del virus quedarían expuestos.⁷¹ De este modo, el sistema inmunitario del huésped podría reconocerlos y atacar al virus.⁷² Las cepas virales resistentes que aparecen bajo la presión de las lectinas son, además, sensibles a la acción de otros fármacos que inhiben el proceso de entrada del VIH.

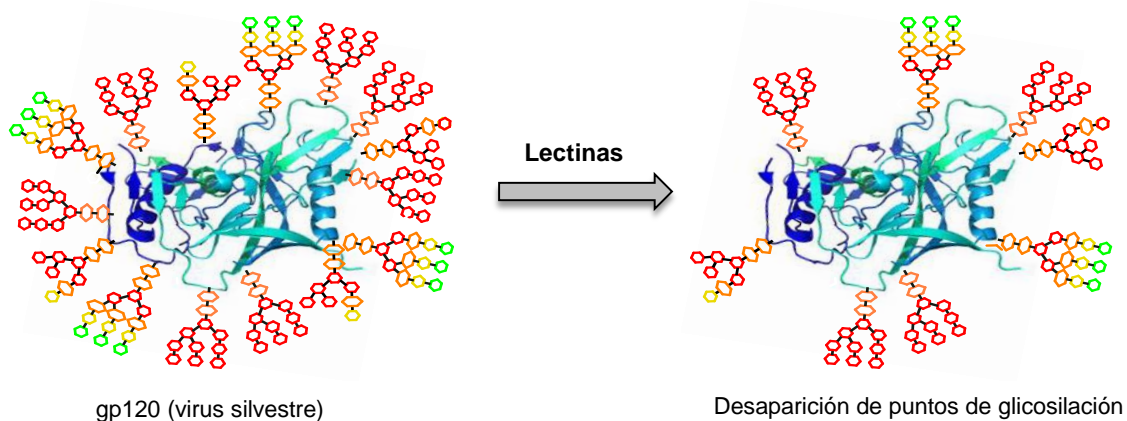


Figura 20. Sitios de glicosilación en la gp120 del VIH

La especificidad de determinadas lectinas por el VIH parece residir en la inusual densidad de azúcares de la glicoproteína gp120 y en la capacidad de dichas lectinas para interactuar con residuos terminales de manosa presentes en la superficie del VIH, que no son habituales en las células de mamíferos.⁷³

Por tanto las lectinas, y por extensión aquellos compuestos que interaccionen con la glicoproteína gp120 simulando la acción de éstas, podrían actuar sobre la replicación viral por un mecanismo dual: en primer lugar, y mediante una acción directa, impidiendo los procesos de entrada y fusión del virus, y en segundo lugar, mediante un mecanismo indirecto, favoreciendo la aparición de cepas virales resistentes que han perdido los sitios de *N*-glicosidación y poseen los epítomos inmunogénicos expuestos. Este hecho podría favorecer el reconocimiento del VIH por el sistema inmune del huésped lo que conduciría a una caída considerable en la carga vírica.⁷²

Debido a su naturaleza proteica y elevado peso molecular (~8.5 a 50 KDa), las lectinas naturales no presentan las propiedades farmacocinéticas adecuadas para su posible consideración como fármacos y es por ello por lo que resultaría deseable disponer de moléculas sintéticas diferentes capaces de actuar mediante un mecanismo similar al de las lectinas naturales. Además, muchas de ellas poseen propiedades mitogénicas, aglutinantes de glóbulos rojos y algunas pueden originar procesos inflamatorios, toxicidad celular y desencadenar una respuesta inmunitaria, lo que comprometería su eventual eficacia antiviral. Las lectinas son también relativamente costosas de producir y purificar a gran escala, pudiendo presentar problemas de estabilidad y almacenaje.⁷⁴

Por todo ello, en los últimos años se está investigando activamente en compuestos no proteicos de menor peso molecular con capacidad para el reconocimiento de carbohidratos. Hace más de una década, se descubrió que la pradimicina A (Figura 21), un antibiótico antifúngico no peptídico y estructura compleja, producido por el actinomiceto *Actinomadura hibisca*, era capaz de inhibir la replicación del VIH mediante un mecanismo de acción similar al de las lectinas naturales. Se ha sugerido que la actividad anti-VIH mostrada por dicho compuesto podría ser debida a la unión con el disacárido terminal de α -(1-2)-manosa, muy abundante en los oligosacáridos presentes en la cubierta del VIH. Por tanto, la pradimicina A constituye la primera molécula pequeña de naturaleza no peptídica capaz de actuar de este modo y desde este punto de vista se puede considerar como una nueva clase de "lectina artificial" que posee actividad anti-VIH y que fuerza al virus a seguir un patrón único de mutación que tiene como resultado alteraciones en la glicoproteína gp120 de la cubierta viral.⁷⁴

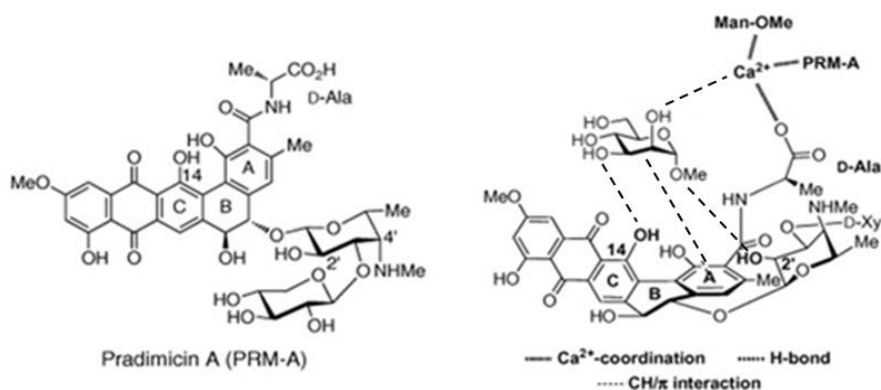


Figura 21. Estructura de pradimicina A. Modelo de unión entre PRM-A y Manosa-OMe

El proyecto iniciado en el año 2006 en nuestro grupo de investigación, anteriormente mencionado, tenía como objetivo la síntesis de “lectinas artificiales” con un mecanismo similar al de las lectinas naturales y a la pradimicina. Para su diseño se tuvieron en cuenta el tipo de interacciones que establecen las lectinas con los carbohidratos de la cubierta viral, que son múltiples, de baja afinidad y de tipo no covalente, en concreto enlaces de hidrógeno, interacciones CH- π , fuerzas de Van der Waals, etc. El mecanismo empleado por las lectinas para aumentar la afinidad y especificidad en el reconocimiento, consiste en establecer múltiples interacciones con los carbohidratos con los que interaccionan (teoría de la multivalencia).^{66,67,68}

En concreto se sintetizaron compuestos con un núcleo central o “scaffold” al que se le unieron varios grupos con reconocida capacidad para interaccionar con carbohidratos (ligantes de carbohidratos). Como ligantes de carbohidratos se utilizaron tanto fenoles⁷⁵ como aminoácidos con anillos aromáticos o grupos amida en su cadena lateral,⁷⁶ capaces de mimetizar las interacciones no covalentes presentes en la unión lectina-carbohidrato. En el caso concreto de los aminoácidos como agentes ligantes de carbohidratos se empleó como núcleo central el anillo de 1,3,5-triazina. Los tres átomos de nitrógeno presentes en dicho anillo, así como las distintas condiciones empleadas para derivatizar cada uno de ellos permitieron la preparación de una amplia colección de moléculas, monómeros, dímeros y trímeros con anillos de triazina sustituidos con distintos aminoácidos (Figura 22).

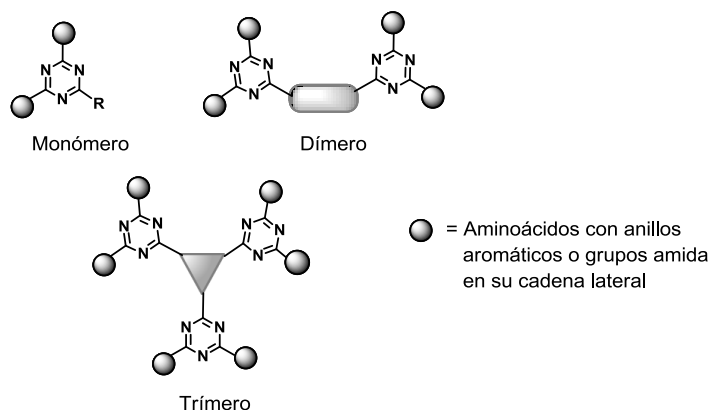


Figura 22. Fórmula general de monómeros, dímeros y trímeros derivados de triazina

Mientras que ninguno de los monómeros o dímeros sintetizados mostraron actividad significativa frente a VIH, el trímero **AL-195** (Figura 23), con un anillo central de 2,4,6-trietilbenceno sustituido con tres anillos de 1,3,5-triazina y 6 aminoácidos aromáticos (triptófano) en la periferia, mostró actividad anti-VIH a nivel micromolar ($CE_{50} = 16 \mu M$) y no resultó tóxico ($CC_{50} > 250 \mu M$).⁷⁷ Además, mediante experimentos de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) se demostró que dicho compuesto interacciona con la glicoproteína gp120 del VIH con una constante de afinidad $K_D = 14 \mu M$.⁷⁷ Estos datos demuestran que la multivalencia desempeña un papel crucial tanto en la actividad como en la interacción con gp120.

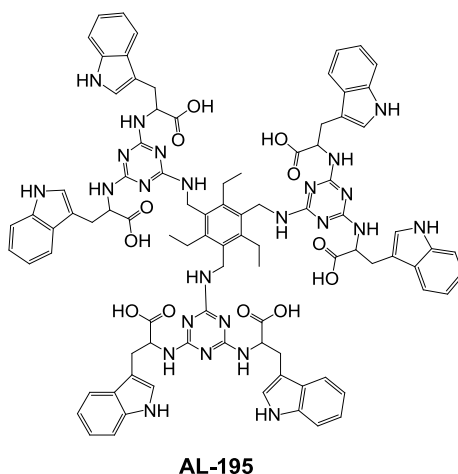


Figura 23. Estructura del derivado de triazina **AL-195** con actividad anti-VIH

En base a estos prometedores resultados, en nuestro grupo de investigación continuamos trabajando en este tipo de estructuras con el objetivo de aumentar el número de triptófanos de la periferia para conseguir un mayor número de interacciones con los carbohidratos de la glicoproteína gp120 y de este modo obtener compuestos más potentes y selectivos que el prototipo **AL-195**. Para ello se prepararon dendrímeros con 9, 12, 15 y 18 triptófanos (Trp) en la periferia con diferentes esqueletos centrales (Figura 24).⁷⁶ Entre ellos se encontraron compuestos con actividad frente a VIH en el rango submicromolar.

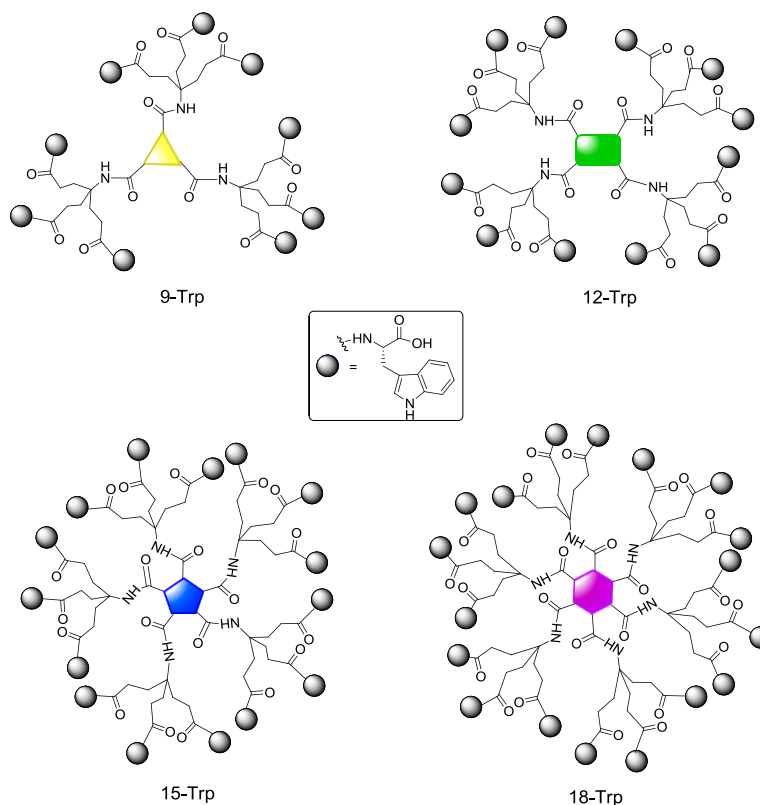


Figura 24. Estructura general de dendrímeros de Trp sintetizados en nuestro grupo de investigación

Los dendrímeros de Trp sintetizados, también fueron evaluados frente a la replicación de un amplio panel de virus tanto ADN como ARN, con y sin cubierta, tales como: virus herpes simplex 1 y 2, virus corona felino y corona humano, virus de la hepatitis C y virus chikungunya, entre otros. Los resultados obtenidos indicaron que todos ellos son inactivos frente a los virus mencionados, mientras que inhiben la replicación de los virus EV71 y ECHO11, pertenecientes a la familia de enterovirus, mostrando incluso alguno de ellos actividad sub-micromolar.

El prototipo de esta familia de dendrímeros con actividad dual frente a VIH ($CE_{50} = 2.3 \pm 0.3 \mu M$) y EV71 ($CE_{50} = 0.3 \pm 0.07 \mu M$), es el compuesto **AL-385** (Figura 25), con un núcleo central de pentaeritritol, espaciadores trivalentes y 12 residuos de triptófano en la periferia. Dichos residuos de Trp se unen al núcleo central a través de sus grupos amino, por lo que los grupos ácidos se encuentran libres y expuestos hacia la periferia.⁷⁸

Ensayos de tiempo de adición indicaron que **AL-385** actúa en etapas tempranas del ciclo replicativo de VIH, probablemente inhibiendo la entrada de dicho virus en la célula huésped. Además, experimentos de SPR demostraron que dicho compuesto interacciona con las glicoproteínas gp120 y gp41 de la superficie del VIH.

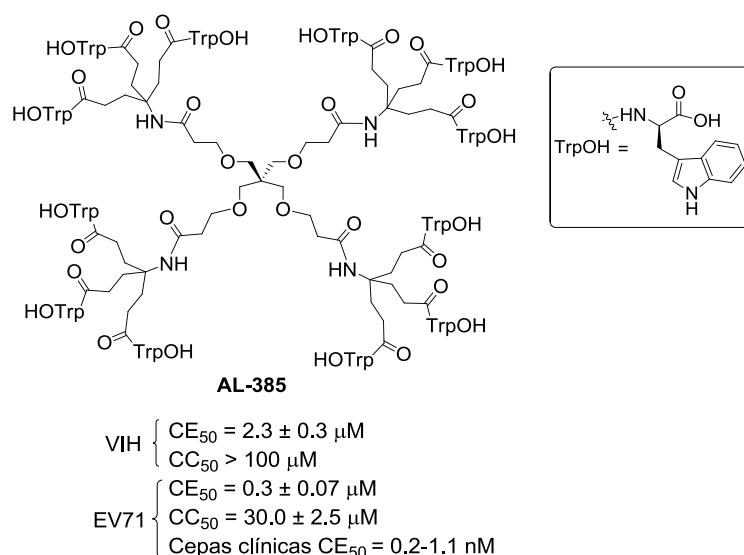


Figura 25. Estructura y datos de actividad frente a VIH y EV71 del compuesto **AL-385**

Es importante señalar que recientemente **AL-385** ha mostrado, además, actividad subnanomolar ($CE_{50} = 0.2-1.1 nM$) frente a diferentes cepas clínicas de EV71 aisladas de pacientes,⁷⁸ lo que supone un aumento en la actividad de más de 1000 veces con respecto a la actividad mostrada frente a cepas de laboratorio.

Ante todo lo expuesto y dado que hasta el momento no se han descrito inhibidores eficaces frente a la replicación del EV71, consideramos que estamos ante un resultado de interés en el que pretendemos seguir trabajando. Así y tomando como prototipo el compuesto **AL-385**, en la presente Tesis Doctoral nos proponemos los siguientes objetivos:

1. **Completar los estudios de relaciones estructura-actividad para determinar los requisitos estructurales necesarios para la actividad y obtener compuestos más potentes y selectivos.** Con este objetivo, se llevaron a cabo modificaciones tanto en la periferia como en los espaciadores presentes en el prototipo. Los resultados obtenidos se recogen en los capítulos 1 y 2 de la presente Tesis Doctoral.
2. **Sintetizar compuestos de menor peso molecular y mejores propiedades farmacocinéticas que el prototipo.** Para ello se prepararon derivados con tan solo tres y cuatro residuos de triptófano sustituidos en las posiciones N1, C2 o C7 del anillo de indol con anillos aromáticos portadores de distintos grupos funcionales. La síntesis de estos compuestos se describe en el capítulo 3 de la presente memoria.
3. **Completar los estudios biológicos para determinar el mecanismo de acción de los dendrímeros de Trp frente a EV71.** Para determinar la diana y el mecanismo de acción de nuestros compuestos frente a EV71, se llevaron a cabo experimentos de selección y caracterización de cepas virales resistentes, así como la preparación de un

derivado fluorescente. Los resultados obtenidos se describen en el capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral.

4. **Estudios *in vivo*.** Para estos estudios, se empleó un modelo de ratón capaz de reproducir la infección por EV71 que ha sido desarrollado por el equipo de biólogos del Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica), con los que colaboramos en este proyecto. Los resultados obtenidos se recogen en el capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral.

Todos los ensayos y experimentos realizados frente a VIH, incluidos en la presente memoria, se llevaron a cabo por el grupo del Prof. Jan Balzarini en el Rega Institute for Medical Research. Asimismo, los distintos estudios biológicos frente a EV71 fueron realizados por el grupo del Prof. Johan Neyts también en el Rega Institute for Medical Research.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. <http://www.unaids.org/es>
2. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T lymphotropic Retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220 (4599), 868-871.
3. Powell, K. L.; Darby, G. HIV reverse transcriptase as a target for antiviral drugs. *Desig of Anti-AIDS drugs*. Ed. De Clercq, E. Elsevier. Amsterdam. **1990**, 123-140.
4. De Clercq, E. Antiviral agents and human viral diseases. *4th Ed. Lippincott Raven Publisher*. Philadelphia. **1997**, 1-14.
5. Engelman, A.; Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, 10, 279-290.
6. www.csic.es/noticias
7. www.fda.gov
8. <https://infosida.nih.gov>
9. Deeks, S. G.; Lewin, S. R.; Ross, A. L.; Ananworanich, J.; Benkirane, M.; Cannon, P.; Chomont, N.; Douek, D.; Lifson, J. D.; Lo, Y.-R.; Kuritzkes, D.; Margolis, D.; Mellors, J.; Persaud, D.; Tucker, J. D.; Barre-Sinoussi, F. and International AIDS Society Towards a Cure Working Group. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat. Med.*, **2016**, 22, 839-850.
10. Edelstein, L. C.; Micheva-Viteva, S.; Phelan, B. D.; Dougherty, J. P. Short communication: activation of latent HIV type 1 gene expression by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), an HDAC inhibitor approved for use to treat cutaneous T cell lymphoma. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **2009**, 25, 883-887.
11. Yerly, S.; Kaiser, L.; Race, E.; Bru, J. P.; Clavel, F.; Perrin, L. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet*, **1999**, 354 (9180), 729-733.
12. Balzarini, J.; Van Damme, L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet*, **2007**, 369, 787-797.
13. Abdool Karim, Q.; Abdool Karim, S. S.; Frohlich, J. A.; Grobler, A. C.; Baxter, C.; Mansoor, L. E. Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science*, **2010**, 329, 1168 -1174.
14. Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serramía, M. J.; López-Fernández, L.; De la Mata, J.; Álvarez, S.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J. Control Release*. **2012**, 161 (3), 949-958.
15. Opar, A. New HIV drug clases on the horizon. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 258-259.

16. Geijtenbeek, T.B.H.; Kwon, D. S.; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G.C.F.; Middel, J.; Cornelissen, I.L.M.H.A.; Nottet, H.S.L.M.; KewalRamani, V. N.; Littman, D. R.; Figdor, C. G.; van Kooyk, Y. DC-SIGN, a Dendritic Cell–Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell*, **2000**, 100, 587-597.
17. Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T.B.H. DC-SIGN: Escape Mechanism For Pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3 (9), 697-709.
18. Wu, L.; KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 859-868.
19. Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Kuo-Hsiung, L. HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29 (2), 369-393.
20. Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R.; Bolognesi, D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CDA lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (3), 215-225.
21. Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C.; Webster, R.; Armour, D.; Price, D.; Stammen, B.; Wood, A.; Perros, M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (11), 4721-4732.
22. Mondor, I.; Ugolini, S.; Sattentau, Q. J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J. Virol.* **1998**, 72 (5), 3623-3634.
23. Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Zhao, L.; Olson, W.; Kwong, P. D.; Sattentau, Q. J. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **2000**, 74 (4), 1948-1960.
24. McReynolds, K.; Gervay-Hague, J. Chemotherapeutic interventions targeting HIV interactions with host-associated carbohydrates. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (5), 1533-1552.
25. Ito, M.; Baba, M.; Sato, A.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Shigeta, S. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Antiviral Res* **1987**, 7, 361-367.
26. Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Arnout, J.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, 85, 6132-6136.
27. Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; González-Scarano, F.; Fantini, J. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *The J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24349-24353.

28. Meanwell, N. A.; Wallace, O. B.; Fang, H.; Wang, H.; Deshpande, M.; Wang, T.; Yin, Z.; Zhang, Z.; Pearce, B. C.; James, J.; Yeung, K-S.; Qiu, Z.; Wright, J. J. K.; Yang, Z.; Zadjura, L.; Tweedie, D. L.; Yeola, S.; Zhao, F.; Ranadive, S.; Robinson, B. A.; Gong, Y-F.; Wang, H-G. H.; Blair, W. S.; Shi, P-Y.; Colonno, R. J. and Lin, P-F. Inhibitors of HIV-1 attachment. Part 2: An initial survey of indol substitution patterns. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1977-1981.
29. Haqqani, A. A.; Tilton, J. C. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research* **2013**, 98, 158-170.
30. Witvrouw, M.; Fikkert, V.; Pluymers, W.; Matthews, B.; Mardel, K.; Schols, D.; Raff, J.; Debyser, Z.; De Clercq, E.; Holan, G.; Pannecouque, C. Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, 58 (5), 1100–1108.
31. Vacas Cordoba, E.; Arnaiz, E.; Relloso, M.; Sanchez-Torres, C.; Garcia, F.; Perez-Alvarez, L.; Gomez, R.; de la Mata, F. J.; Pion, M.; Muñoz-Fernandez, M. A. Development of sulphated and naphthylsulphonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *AIDS*, **2013**, 27 (8), 1219–1229.
32. Tabarani, G.; Reina, J. J.; Ebel, C.; Vives, C.; Lortat-Jacob, H.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* **2006**; 580 (10), 2402–2408.
33. Helenius, A.; Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **2001**, 291, 2364-2369.
34. Scanlan, C.N.; Offer, J.; Zitzmann, N.; Dwek, R.A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature*, **2007**, 446, 1038-1045.
35. Botos, I.; Wlodawer, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, 88, 233-282.
36. Reitter, J. N.; Means, R. E. and Desroiers, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **1998**, 4 (6), 679-684.
37. Jay, J. I.; Lai, B. E.; Myszka, D. G.; Mahalingam, A.; Langheinrich, K.; Katz, D. F.; Kiser, P. F. Multivalent benzoboroxole functionalized polymers as gp120 glycan targeted microbicide entry inhibitors. *Mol. Pharmaceutics*, **2010**, 7, 116-129.
38. Kuo, R-L.; Shih, S-R. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virology Journal*, **2013**, 10:28, 1-8.
39. Wu, K. X.; Ng, M. M-L.; Chu, J. J. H. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71. *Drug Discovery Today*, **2010**, 15, 1041-1051.
40. ECDC [European Center for Disease Prevention and Control] Week 22, 29 May-4 Jun 2016 <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Communicable-disease-threats-report-4-june-2016.pdf>

41. ProMED-mail post Human enterovirus-Spain: (CT) <http://promedmail.org/post/20160524.4242904> for earlier report on this enterovirus outbreak in Catalonia, Spain.
42. Plevka, P.; Perera, R.; Cardosa, J.; Kuhn, R. J.; Rossmann M. G. Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Science*, **2012**, 336, 1274.
43. Wang, X.; Peng, W.; Ren, J.; Hu, Z.; Xu, J.; Lou, Z.; Li, X.; Yin, W.; Shen, X.; Porta, C.; Walter, T. S.; Evans, G.; Axford, D.; Owen, R.; Rowlands, D. J.; Wang, J.; Stuart, D. I.; Fry, E. E.; Rao, Z. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2012**, 19, 424-430.
44. Shih, S. R.; Chen, S. J.; Hakimelahi, G. H.; Liu, H.J.; Tseng, Ch. J.; Shia, K. S. Selective human enterovirus and rhinovirus inhibitors: An overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules. *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, (4), 449-470.
45. Yamayoshi, S.; Ohka, S.; Fujii, K.; Koike, S. Functional Comparison of SCARB2 and PSGL-1 as receptors for Enterovirus 71, *J. Virol.*, **2013**, 87 (6), 3335-3347.
46. Rueckert, R. R. Picornavirus and their multiplication. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology, 2nd edn. Raven Press, New York*, **1990**, 507-548.
47. Kuo, R-L.; Shih, S-R. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virology Journal*, **2013**, 10:28, 1-8.
48. Pevear, D. C.; Tull, T. M.; Seipel, M. E.; Groarke, J. M. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 2109–2115.
49. Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; van Eemeren, K.; Stokbroekx, R.; Janssen, P. A.. In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 100–107.
50. Ren, J.; Wang, X.; Hu, Z.; Gao, K.; Sun, Y.; Li, X.; Porta, C.; Walter, T. S.; Gilbert, R. J.; Zhao, Y.; Axford, D.; Williams, M.; McAuley, K.; Rowlands, D. J.; Yin, W.; Wang, J.; Stuart, D. I.; Rao, Z.; Fry, E. E. Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. *Nat. Commun.* **2013**, DOI: 10.1038/ncomms2889.
51. Wang, Y.; Qing, J.; Sun, Y.; Rao, Z. Suramin inhibits EV71 infection. *Antiviral Research*, **2014**, 103, 1–6.
52. Arita, M.; Wakita, T.; Shimizu, H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J. Gen. Virol.*, **2008**, 89, 2518-2530.
53. Dragovich, P.S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Marakovits, J. T.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Lee, C. A.; Ford, C. E.; Burke, B. J.; Rejto, P. A.; Hendrickson, T. F.; Tuntland, T.; Brown, E. L.; Meador III, J. W.; Ferre, R. A.; Harr, J. E. V.; Kosa, M. B.; Worland, S. T. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 4. Incorporation of P1 lactam moieties as L-glutamine replacements. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1213–1224.

54. Zhang, Y.; Yan, D.; Li, Q.; Dong, X.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Wan, J.; Feng, Z.; Sun, J.; Wang, S.; Li, D.; Xu, W. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand, foot and mouth disease in Fuyang city of China. *J. Virol.* **2010**, 7, 94, 1-9.
55. Matthews, D. A.; Dragovich, P. S.; Webber, S. E.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Zalman, L. S.; Hendrickson, T. F.; Love, R. A.; Prins, T. J.; Marakovits, J. T. Structure-assisted design of mechanism-based irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease with potent antiviral activity against multiple rhinovirus serotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96 (20), 11000–11007.
56. Cui, S.; Wang, J.; Fan, T.; Qin, B.; Guo, L.; Lei, X.; Wang, M.; Jin, Q. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease. *J. Mol. Biol.*, **2011**, 408 (3), 449–461.
57. Petersen, J. F.; Cherney, M. M.; Liebig, H. D.; Skern, T.; Kuechler, E.; James, M. N. The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *J. EMBO.* **1999**, 18 (20), 5463–5475.
58. Baxter, N. J.; Roetzer, A.; Liebig, H. D.; Sedelnikova, S. E.; Hounslow, A. M.; Skern T.; Waltho, J. P. Structure and Dynamics of Coxsackievirus B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease. *J. Virol.* **2006**, 80 (3), 1451–1462.
59. Kuechler, E. In: Semler, B. L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, **2002**, 301–311.
60. Strauss, D. M.; Wuttke, D. S. characterization of protein-protein interactions critical for poliovirus replication: analysis of 3AB and VPg binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **2007**, 81, 6369-6378.
61. Hung, H. C.; Chen, T. C.; Fang, M. Y.; Yen, K. J.; Shih, S. R.; Hsu, J. T-A; Tseng, C. P. Inhibition of enterovirus 71 replication and the viral 3D polymerase by aurintricarboxylic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, 65, 676–683.
62. Hung, H. C.; Wang, H. C.; Shih, S. R.; Teng, I. F.; Tseng, C. P.; Hsu, J. T. Synergistic inhibition of Enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. *J. Infect. Dis.*, **2011**, 203 (12), 1784–1790.
63. Tijssma, A.; Franco, D.; Tucker, S.; Hilgenfeld, R.; Froeyen, M.; Leyssen, P.; Neyts, J. The capsid binder vapendavir and the novel protease inhibitor SG85 inhibit enterovirus 71 replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 6990–6992.
64. Lu, J.; Yi, L.; Zhao, J.; Yu, J.; Chen, Y.; Lin, M. C.; Kung, H. F.; He, M. L. Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the level of interferon receptor 1. *J. Virol.*; **2012**, 86 (7), 3767–3776.
65. Thibaut, H. J.; Leyssen, P.; Puerstinger, G.; Muigg, A.; Neyts, J.; De Palma, A. M. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Res.*; **2011**, 90 (3), 213–217.

66. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (20), 2755-2794.
67. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A. influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (50), 14922-14933.
68. Liu, Y. A.; Carroll, J. R.; Holt, L. A.; McMahon, J.; Giomarelli, B.; Ghirlanda, G. Multivalent Interactions with gp120 are required for the anti-HIV activity of cyanovirin. *Biopolymers*, **2009**, 92 (3), 194-200.
69. Balzarini, J.; Hatse, S.; Vermeire, K.; Princen, K.; Aquaro, S. and Perno, C. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48 (10), 3858-3870.
70. Balzarini, J.; Laethem, K. V.; Hatse, S.; Froeyen, M.; Damme, E. V.; Bolmstedt, A.; Peumans, W.; de Clercq, E.; Schols, D. Marked depletion of glycosylation sites in HIV-1 gp120 under selection pressure by the mannose-specific plant lectins of *hippeastrum* hybrid and *galanthus nivalis*. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 1556-1565.
71. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Hatse, S.; Froeyen, M.; Peumans, W.; Van Damme, E.; Schols, D. carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV gp120: A new therapeutic concept to hit the achilles heel of HIV. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (49), 41005-41014.
72. Balzarini, J. Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *The Lancet* **2005**, 5, 726-731.
73. Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 237-247.
74. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T.; Schols, D. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compound for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **2007**, 81 (1), 362-373.
75. a) Balzarini, J.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Casanova, E.; Carrero, P. Gp120-binding benzene compounds and saccharide compounds. WO 2011/085454 A1 (**2011**). b) Carrero, P.; Ardá, A.; Alvarez, M.; Doyagüez, E.G.; Rivero-Buceta, E.; Quesada, E.; Prieto, A.; Solis, D.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; Jimenez-Barbero, J.; San-Félix, A. Differential recognition of mannose-based polysaccharides by tryptodan receptors based on a triethylbenzene scaffold substituted with trihydroxybenzoyl moieties. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 65-76. c) Flores, A.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; Quesada, E. Multivalent agents containing 1-substituted 2,3,4-trihydroxyphenyl moieties as novel synthetic polyphenols directed against HIV-1. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 5278-5294.

- d) Rivero-Buceta, E.; Carrero, P.; Doyagüez, E.G.; Madrona, A.; Quesada, E.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; Leyssen, P.; Paeshuyse, J.; Balzarini, J.; Neyts, J.; San-Félix, A. Linear and branched alkyl-esters and amides of gallic acid and other (mono-, di- and tri-) hydroxy benzoyl derivatives as promising anti-HCV inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 656-671. e) Rivero-Buceta, E.; Carrero, P.; Casanova, E.; Doyagüez, E.G.; Madrona, A.; Quesada, E.; Pérez-Pérez, M.J.; Mateos, R.; Bravo, L.; Mathys, L.; Noppen, S.; Kiselev, E.; Marchand, C.; Pommier, Y.; Liekens, S.; Balzarini, J.; Camarasa, M.J.; San-Félix, A. Anti-HIV-1 activity of a tripodal receptor that recognizes mannose oligomers. *Eur. J. Med.Chem.* **2015**, 132-143.
76. Rivero-Buceta, E.; Doyagüez, E.G.; Colomer, I.; Quesada, E.; Mathys, L.; Noppen, S.; Liekens, S.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; Balzarini, J.; San-Félix, A. Tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication, prevent virus entry and bind to the HIV envelope glycoproteins gp120 and gp41. *Eur. J. Med.Chem.* **2015**, 34-43.
77. Lozano, V.; Aguado, L.; Hoorelbeke, B.; Reners, M.; Camarasa, M.J.; Schols, D.; Balzarini, J.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J. Targeting HIV entry through interaction with envelope glycoprotein 120 (gp120): Synthesis and antiviral evaluation of 1,3,5-triazines with aromatic amino acids. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5335-5348.
78. Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donkers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. Optimization of a class of tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication leads to a selective, specific and low-nanomolar inhibitor of clinical isolates of enterovirus A71. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2016**, *60*, 5064-5067.

Capítulo 1. Modificaciones en la periferia del prototipo AL-385

El trabajo que se describe en el presente capítulo tiene como punto de partida el dendrímero **AL-385**¹ (Figura 1), descrito previamente en nuestro grupo de investigación, cuyos rasgos estructurales más importantes son la presencia de un esqueleto central de pentaeritritol, espaciadores trivalentes y triptófano en la periferia con su grupo ácido carboxílico libre.

El objetivo global del trabajo es, por un lado determinar el papel de los distintos fragmentos estructurales de la periferia en la actividad anti-VIH y EV71, y por otro, obtener compuestos más potentes que el prototipo **AL-385**. Nuestros objetivos concretos son los siguientes:

- 1- Determinar la importancia de la cadena lateral del aminoácido en la actividad antiviral, para lo que decidimos sustituir los residuos de triptófano por aminoácidos no aromáticos como alanina y aromáticos como fenilalanina y tirosina.
- 2- Conocer la importancia que tienen los ácidos carboxílicos libres (COOH) en la actividad, para lo cual se llevó a cabo la síntesis de un derivado de triptamina (análogo de triptófano sin grupo ácido).
- 3- Determinar el papel del NH del anillo de indol en la actividad antiviral, para lo cual decidimos preparar un derivado *N*-Metilado de triptófano.

Las modificaciones comentadas se encuentran reflejadas de modo esquemático en la Figura 1.

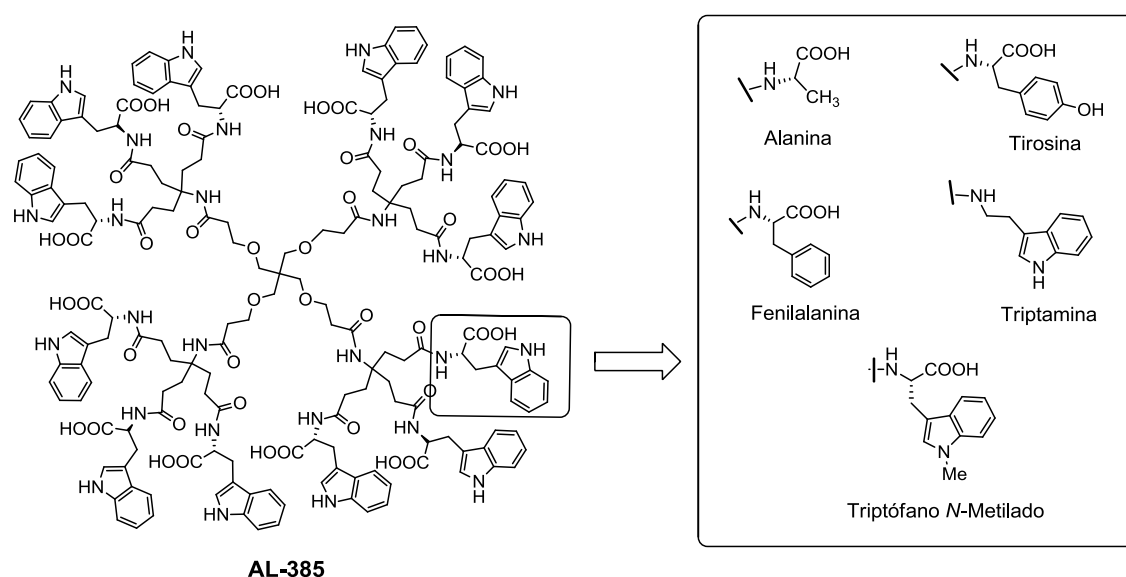


Figura 1. Modificaciones llevadas a cabo en la periferia del prototipo **AL-385**

La preparación de los compuestos sintetizados en este capítulo requirió la puesta a punto de herramientas sintéticas adecuadas que permitiesen anclar simultáneamente un número elevado de aminoácidos sobre un esqueleto central. Para ello, se han seguido estrategias similares a las empleadas para la síntesis de dendrímeros que vamos a ver a continuación.

Síntesis de dendrímeros

Los dendrímeros, como se ha comentado en la introducción de esta memoria, son moléculas altamente ramificadas con un tamaño uniforme y controlado y con elevada densidad de grupos funcionales en la periferia. Los elementos estructurales necesarios para la preparación de dendrímeros son un núcleo central o “core” de donde emergen las ramificaciones (nodos) a las que se incorporan los grupos terminales (en nuestro caso aminoácidos) que son los que quedan expuestos en la superficie (Figura 2).

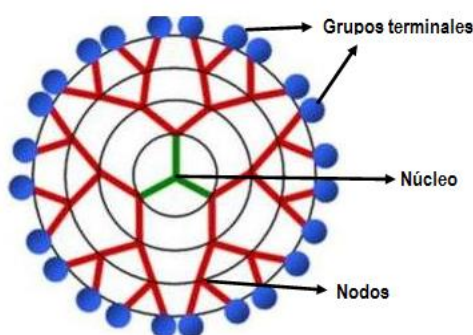


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero

Para la síntesis de dendrímeros es necesaria la elección de las unidades estructurales de construcción o monómeros, el núcleo de crecimiento y una secuencia sintética cuya repetición permita el crecimiento. Los diferentes métodos de síntesis pueden englobarse dentro de dos grandes estrategias sintéticas generales: divergente y convergente.

En la estrategia **divergente**, desarrollada por Tomalia y colaboradores,² el compuesto se construye desde el núcleo polifuncional seleccionado hacia la superficie (Figura 3). El núcleo se hace reaccionar con el correspondiente monómero y posteriormente se realiza la activación de los grupos situados en la periferia. La repetición sucesiva de estos pasos conduce al crecimiento simultáneo de todas las ramas intermedias, dando lugar a las diferentes generaciones del dendrímero. Esta estrategia funciona bien para la obtención de grandes cantidades de compuesto; sin embargo, a medida que hay más grupos funcionales en la periferia (dendrímeros de altas generaciones) es más probable que se produzcan defectos estructurales en el crecimiento, ya que al aumentar la generación, crece el número de enlaces covalentes que se deben formar en una única etapa sintética, lo que puede conducir a reacciones incompletas donde no todos los enlaces se han formado.

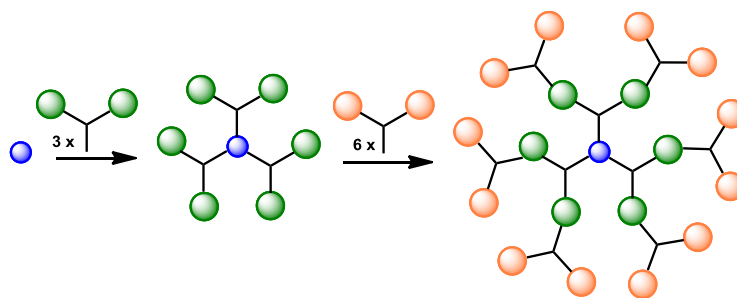


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia divergente

La otra estrategia sintética, conocida como **convergente**, fue descrita por Fréchet y colaboradores,³ en ella el compuesto se construye desde la superficie hacia el núcleo (Figura 4). En primer lugar, se sintetiza cada rama dendrítica o dendrón finalizando la síntesis con la unión de los dendrones a un núcleo polifuncional. El problema de esta estrategia reside en la última etapa, ya que dependiendo del núcleo y de la generación pueden existir impedimentos estéricos, sobre todo cuando los dendrones son de generaciones elevadas.

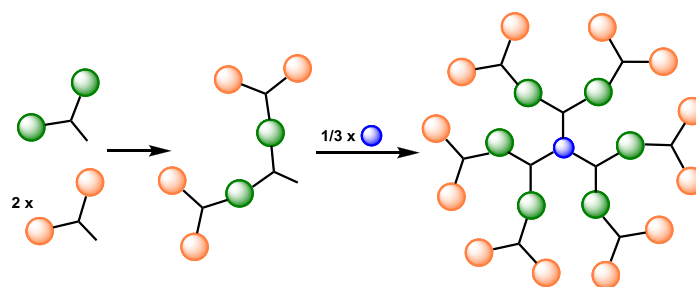
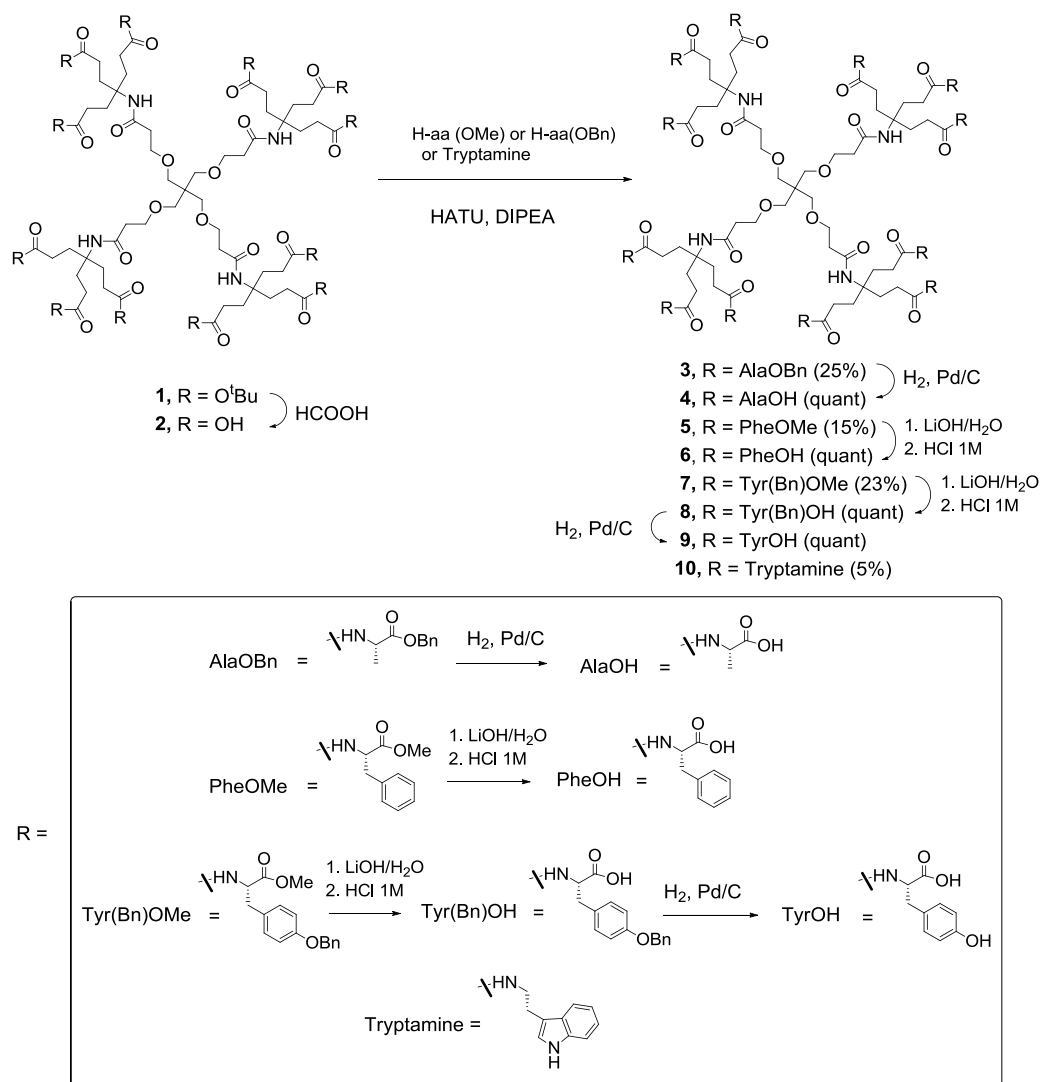


Figura 4. Representación esquemática de la estrategia convergente

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Síntesis de los dendrímeros modificados en la periferia

Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos modificados en la periferia se empleó, en primer lugar la aproximación divergente en la que, tal y como se ha comentado anteriormente, los dendrímeros se construyen desde el núcleo central hacia la periferia. Como compuesto de partida se empleó el derivado comercial **1**, en el que un anillo de pentaeritritol extendido va unido a un amplificador trivalente a través de un enlace amida. La desprotección de los grupos protectores *tert*-butilo (*t*Bu) del compuesto **1** en medio ácido (ácido fórmico), condujo al políácido **2**¹ con rendimiento cuantitativo, que fue empleado en la etapa siguiente sin necesidad de purificación (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de los dendrímeros propuestos mediante estrategia divergente

La síntesis del derivado de alanina **3** se llevó a cabo, con un 25% de rendimiento, mediante acoplamiento del poliácido **2** con el aminoácido H-AlaOBn·HCl en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base. El grupo bencilo presente en dicho aminoácido, facilitó el seguimiento cromatográfico así como la purificación de la reacción, que se realizó mediante cromatografía de media presión en fase reversa. Para la síntesis del dendrímero con tirosina en la periferia se emplearon las condiciones de acoplamiento anteriormente comentadas (HATU, DIPEA). En primer lugar, se optó por el empleo de tirosina protegida tanto en su grupo ácido como en el OH fenólico con grupos bencilo (H-Tyr(Bn)OBn·HCl). De esta forma sería posible la desprotección completa mediante hidrogenación catalítica en un solo paso de reacción. Esta opción se descartó cuando la reacción de acoplamiento con el poliácido **2** no condujo al compuesto deseado. Como alternativa decidimos emplear tirosina con el grupo ácido protegido en forma de éster metílico y el OH fenólico como éter bencilico (H-Tyr(Bn)OMe·HCl). En este caso la reacción de acoplamiento y posterior purificación en fase reversa, condujo al compuesto **7** con un 23% de

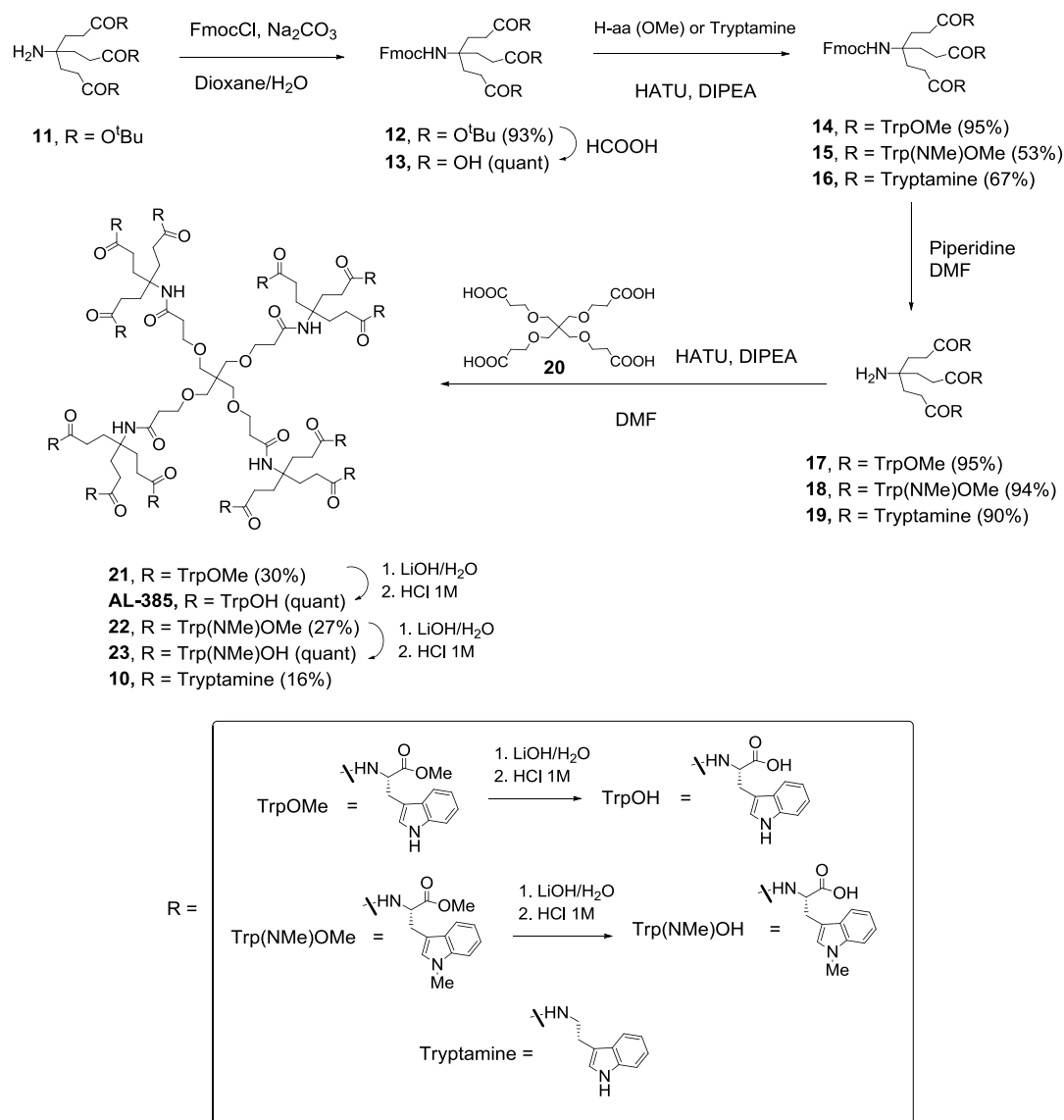
rendimiento. Siguiendo condiciones de acoplamiento y purificación similares a las anteriormente comentadas, se obtuvieron los derivados de fenilalanina **5** y triptamina **10** con un 15% y 5% de rendimiento, respectivamente.

La desprotección de los ésteres metílicos presentes en **5** y **7** mediante tratamiento básico con LiOH·H₂O seguido de acidificación con ácido clorhídrico, condujo a los poliácidos **6** y **8** con rendimientos cuantitativos. La posterior desprotección del derivado de tirosina **8**, mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C, dio lugar al compuesto totalmente desprotegido **9**, con rendimiento cuantitativo. Aplicando las condiciones de hidrogenación catalítica (Pd/C) comentadas para el derivado de tirosina, se llevó a cabo la desprotección del derivado de alanina **3** para dar el compuesto **4** con rendimiento cuantitativo.

La aproximación divergente utilizada hasta el momento, representa una ruta corta en términos de pasos sintéticos. Sin embargo, el alto número de enlaces covalentes (12 enlaces) que se deben formar en el paso de acoplamiento, conduce a reacciones incompletas y a mezclas de compuestos con similares propiedades cromatográficas de difícil purificación. Particularmente difícil resultó la obtención del derivado de triptamina **10**, obtenido con tan solo un 5% de rendimiento, debido a su compleja purificación, así como la del derivado *N*-Metilado de triptófano que no pudo obtenerse mediante esta aproximación. Ante este resultado decidimos explorar una nueva ruta sintética, basada en una aproximación convergente, en la que la síntesis de los dendrímeros se realiza desde la periferia hacia el núcleo.

En primer lugar, la aproximación convergente se puso a punto para la síntesis del compuesto prototipo **AL-385**. En esta ruta resultó clave el empleo del dendrón aminotriéster **11** como producto de partida (Esquema 2). Dicho dendrón, denominado también amina de Behera, ha sido muy utilizado como estructura amplificadora para la preparación de distintos dendrímeros.^{4,5,6} El tratamiento de **11** con cloruro de 9-fluorenilmtoxycarbonilo (FmocCl) en medio básico (Na₂CO₃) condujo al intermedio **12** (93%), NH-Fmoc protegido en su punto focal.^{7,8} La posterior desprotección de los grupos *terc*-butilo presentes en **12**, empleando ácido fórmico a 40 °C, condujo al triácido **13**^{7,8} con rendimiento cuantitativo. La reacción de **13** con H-TrpOMe·HCl en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base, condujo al intermedio **14** (95%) cuya desprotección, empleando piperidina, permitió la obtención del compuesto **17** (95%) con un grupo amino libre en su punto focal. La posterior reacción de **17** con el derivado de pentaeritritol **20**^{9,10} condujo, mediante la formación de enlaces amida, al intermedio **21** (30%) con 12 triptófanos en la periferia protegidos como ésteres metílicos. Finalmente, la desprotección en medio básico (LiOH·H₂O) de los ésteres metílicos presentes en **21**, condujo al compuesto prototipo **AL-385** con rendimiento cuantitativo.

En resumen, la aproximación convergente conduce al compuesto **AL-385** con mejor rendimiento global que el obtenido mediante la aproximación divergente (25% frente a 4%), facilitando considerablemente la purificación de la reacción.



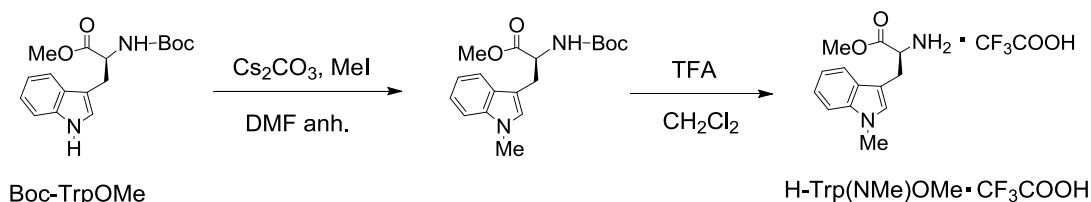
Esquema 2. Síntesis de los dendrímeros propuestos mediante estrategia convergente

Basándonos en los buenos resultados obtenidos mediante la aproximación convergente para la preparación del compuesto prototipo, se aplicó la misma metodología sintética para la obtención del derivado de triptamina **10** y el derivado *N*-Metilado de triptófano **23**, para los que la aproximación divergente resultó poco eficaz.

Así, y siguiendo las condiciones de reacción comentadas para **AL-385**, el triácido **13** se hizo reaccionar, bien con *N*-Metil triptófano (H-Trp(NMe)OMe) o bien con triptamina para obtener, respectivamente, los compuestos **15** (53%) y **16** (67%) (Esquema 2). La desprotección del grupo Fmoc presente en el punto focal de dichos intermedios, seguida de las reacciones de acoplamiento con el derivado de pentaeritritol **20**, condujo a los compuestos **22** (27%) y **10** (16%). La saponificación de los ésteres metílicos de **22** permitió la obtención del dendrímero **23** con rendimiento cuantitativo.

Al igual que ocurrió con el prototipo, el rendimiento del derivado de triptamina **10**, obtenido mediante la aproximación convergente, es mayor que el obtenido mediante la aproximación divergente (16% frente a 5%). Además, la aproximación convergente hizo posible la preparación del derivado *N*-Metilado de triptófano **23** que no pudo ser obtenido mediante la aproximación divergente.

Hay que destacar que el triptófano *N*-Metilado (H-Trp(NMe)OMe), utilizado para la síntesis del compuesto **23**, se obtuvo con excelente rendimiento (98%) por reacción del aminoácido comercial Boc-TrpOMe con yoduro de metilo en medio básico (Cs_2CO_3), seguido de desprotección del grupo Boc en medio ácido (TFA) (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de triptófano *N*-Metilado

Resultados biológicos

Los compuestos sintetizados en este capítulo se evaluaron, en primer lugar, frente a la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular. Además, para los compuestos que presentaron mejor actividad, se determinó su capacidad para interactuar con las glicoproteínas gp120 y gp41 de la cubierta del VIH mediante la técnica de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR). Estos experimentos fueron realizados en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica), bajo la supervisión del Prof. Jan Balzarini.

Además, se llevó a cabo la evaluación de los compuestos frente a la replicación de enterovirus 71 (EV71) en cepas de laboratorio (BrCr) y en cepas clínicas aisladas de pacientes. Estos ensayos fueron realizados por el equipo del Prof. Johan Neyts, también en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

Los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral fueron evaluados frente a la replicación de los Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando la línea celular MT-4. La determinación de la actividad ha estado basada en la inhibición del efecto citopático inducido por el VIH en células MT-4 siguiendo procedimientos descritos.¹¹ La actividad antiviral se expresa como CE_{50} o concentración efectiva 50, que es la

concentración de compuesto que permite proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus. Paralelamente, se ha evaluado la toxicidad de los compuestos expresada como CC_{50} o concentración citotóxica 50, que corresponde a la concentración de compuesto citotóxica para el 50% de las células no infectadas. El cociente entre ambos factores (CC_{50}/CE_{50}) se denomina índice terapéutico o índice de selectividad, y da idea de la seguridad de un compuesto. En general se considera que la actividad antiviral de un compuesto es significativa cuando su índice de selectividad es mayor de 10.

En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos para los compuestos finales **4**, **6**, **9**, **10** y **23**, con sus grupos ácidos desprotegidos. Además, en esta tabla se incluyen los datos de actividad y toxicidad del compuesto prototipo **AL-385**, junto con los de algunos patrones que inhiben fases tempranas del ciclo replicativo del virus, tales como dextran sulfato (DS-5000, un inhibidor de adsorción)¹² y pradimicina A (PRM-A, un inhibidor de la entrada viral con carga negativa que se une a los carbohidratos de la glicoproteína gp120).¹³

Tabla 1. Datos de actividad frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4

Compuesto	VIH-1 CE_{50}^a (μM)	VIH-2 CE_{50}^a (μM)	CC_{50}^b (μM)	Derivado
4	>100	>100	>100	Alanina
6	>28	>28	28	Fenilalanina
9	6.4 \pm 1.4	20 \pm 15	>100	Tirosina
10	45	77	>100	Triptamina
23	1.7 \pm 0.0	7.3 \pm 2.8	>100	N-Metil Trp
AL-385	2.3 \pm 0.3	22 \pm 2.8	>100	Triptófano
DS-5000	0.07 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	>20	-
PRM-A	3.3 \pm 1.2	5.9 \pm 3.7	>100	-

^a CE_{50} : concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células MT-4 del efecto citopático de virus.

^b CC_{50} : concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

El primer dato que merece la pena destacar de los recogidos en la Tabla 1, es que los derivados de alanina **4** y fenilalanina **6**, con un grupo metilo (Me) y un fenilo (Ph) respectivamente en su cadena lateral, son inactivos frente a VIH-1 y VIH-2. Sin embargo, el derivado de tirosina **9**, con un grupo fenol (Ph-OH) en su cadena lateral, muestra actividad significativa frente a VIH. Dicho compuesto resultó 3 veces menos activo frente a VIH-1 que el prototipo, mientras que frente a VIH-2 muestra la misma actividad que éste. Estos resultados sugieren que la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido es importante para la actividad anti-VIH.

El derivado de triptamina **10** resultó 19 veces menos activo que el prototipo, lo que demuestra que los grupos ácidos libres en la periferia son cruciales para la actividad.

La sustitución del indol, presente en **AL-385**, por *N*-Metil indol condujo al compuesto **23**, que resultó tan activo como el prototipo frente a VIH-1 y más activo frente a VIH-2. Este resultado indica que el grupo NH indólico no es imprescindible para la actividad anti-VIH.

Estudios de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) y afinidad por las glicoproteínas gp120 y gp41 de la cubierta viral

A continuación nos propusimos evaluar la capacidad de los compuestos más activos (**9** y **23**) para interaccionar con las glicoproteínas gp120 y gp41 presentes en la cubierta viral. Para ello, utilizamos una técnica basada en un biosensor con detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR), empleando chips con una densidad de 700 RUs para gp120 y de 580 RUs para gp41.

Tal y como se observa en la Figura 5, los compuestos **9** y **23** mostraron afinidad por las glicoproteínas gp120 y gp41 de la superficie del VIH, siendo ésta mayor para el compuesto **23**, lo que está en consonancia con la mayor actividad anti-VIH observada para dicho compuesto (CE_{50} **23** = 1.7 μ M y CE_{50} **9** = 6.4 μ M).

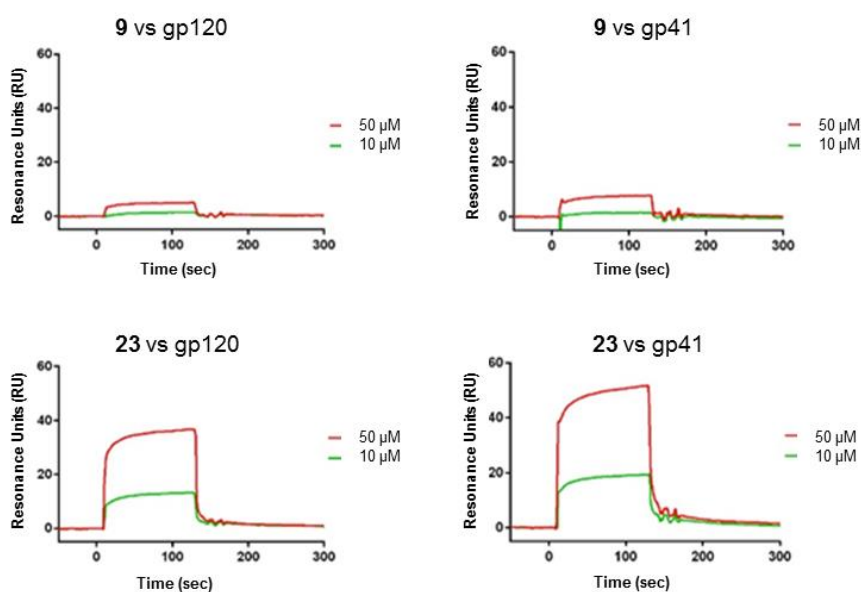
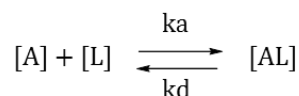


Figura 5. Sensorgramas de los compuestos **9** y **23** frente a gp120 y gp41

Con el objetivo de averiguar la fortaleza de la unión del compuesto **23** con las glicoproteínas gp120 y gp41, decidimos determinar la constante de disociación en el equilibrio (constante de afinidad, K_D). Para ello, asumimos un modelo cinético sencillo de pseudo-primer orden, en el que se considera una interacción 1:1.

De un modo general, el cálculo cinético de la constante de afinidad, K_D , de una molécula de analito A con otra de ligando L para dar un complejo AL, se realiza a partir de las siguientes ecuaciones:



$$(1) \quad \frac{d[AL]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [L] - k_d \cdot [AL]$$

$$(2) \quad \frac{dR}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot (R_{\max} - R) - k_d \cdot R$$

Donde: k_a = constante de velocidad de asociación (1/M·s)

k_d = constante de velocidad de disociación (1/s)

$[A]$ = concentración de analito (en nuestro caso compuesto **23**)

R_{\max} = capacidad máxima de unión de la superficie del chip

R = complejo [AL] formado

En el equilibrio, la asociación es igual a la disociación, lo que implica:

$$(3) \quad k_a \cdot [A] \cdot (R_{\max} - R) = k_d \cdot R \longrightarrow K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \cdot (R_{\max} - R)}{R}$$

En nuestro caso, para la obtención de K_D , se emplearon distintas concentraciones (0.78, 1.56, 3.13, 6.25 y 12.5 μM) del compuesto **23** (Figura 6).

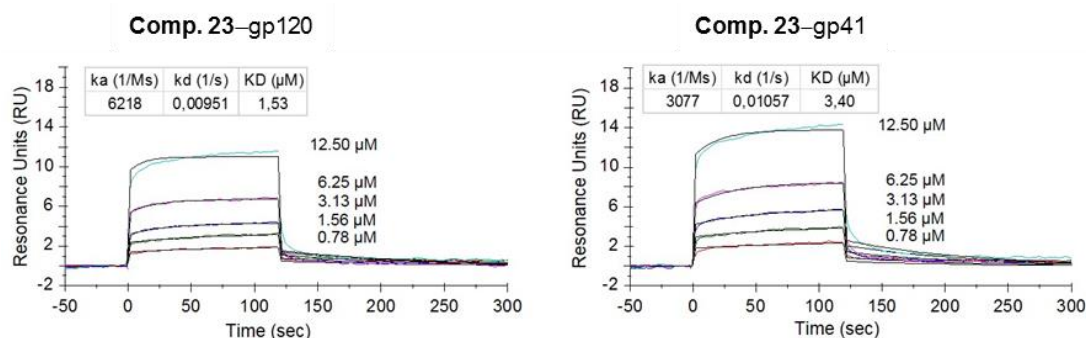


Figura 6. Cálculo de la K_D para el compuesto **23**

A partir de las constantes de velocidad, k_a y k_d , en el equilibrio y teniendo en cuenta la ecuación (3) ($K_D = k_d/k_a$), se determinó que las constantes de afinidad, K_D , obtenidas para los complejos **23**-gp120 (1.53 μM) y **23**-gp41 (3.40 μM), son superiores a las constantes observadas para el prototipo (K_D **AL-385**-gp120 = 6.7 μM y K_D **AL-385**-gp41 = 18 μM).¹⁴ Estos resultados indican que la unión que establece el derivado de *N*-Metil Trp (**23**) con las

glicoproteínas gp120 y gp41 de la superficie viral, es más fuerte que la que establece el prototipo.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de EV71

Los compuestos sintetizados se evaluaron, además frente a la replicación de enterovirus 71 tanto en cepas de laboratorio (BrCr) como en cepas clínicas aisladas de pacientes.

Los datos obtenidos frente a cepas de laboratorio se recogen en la Tabla 2, donde se ha incluido como referencia los datos del prototipo **AL-385** y del pirodavis, un potente inhibidor de entrada capaz de unirse a la cápsida viral.¹⁵ Estos ensayos se llevaron a cabo en cultivo celular empleando células de rabdomiosarcoma (RD) susceptibles de ser infectadas por EV71.

En general, la relación estructura-actividad encontrada para EV71 fue muy similar a la de VIH.

Tabla 2. Datos de actividad frente a EV71 en células RD

Compuesto	EV71 CE ₅₀ ^a (μM)	EV71 CE ₉₀ ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)	Derivado
4	>46	>46	ND	Alanina
6	7.2 ± 0.2	>10	>32	Fenilalanina
9	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.4	>30	Tirosina
10	>33	>33	ND	Triptamina
23	3.6 ± 1.1	5.3 ± 0.9	>27	N-Metil Trp
AL-385	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	>24.9	Triptófano
Pirodavis	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	>54	-

ND = No determinado.

^aCE₅₀: concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

^bCE₉₀: concentración efectiva 90 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 90% de las células del efecto citopático de virus.

^cCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

Así, tal y como se observa en la Tabla 2, el derivado de alanina **4**, con un grupo metilo en su cadena lateral, no resultó activo a la concentración ensayada y el derivado de fenilalanina **6**, con fenilo en su cadena lateral, mostró una actividad 24 veces inferior a la del prototipo. Sin embargo, el derivado de tirosina **9**, con un anillo fenólico en la cadena lateral, mostró una actividad (CE₅₀ = 0.4 ± 0.1 μM) muy similar a la del prototipo **AL-385** (CE₅₀ = 0.3 ± 0.1 μM). El derivado N-Metilado de triptófano **23** resultó 3 veces menos activo que el prototipo, mientras que frente a VIH mostró la misma actividad (Tabla 1).

Estos resultados indican que la presencia de grupos polares, tales como OH y NH en las cadenas laterales de los aminoácidos son importantes para la actividad anti-EV71. Probablemente dichos grupos establezcan interacciones extras mediante puentes de hidrógeno con la cubierta viral.

El derivado de triptamina **10**, sin ácidos carboxílicos en la periferia, fue inactivo frente a EV71 al igual que lo fue frente a VIH, lo que indica la importancia de los ácidos carboxílicos en la periferia para la actividad frente a ambos virus.

Para determinar en qué etapa del ciclo replicativo viral actúan nuestros compuestos, se llevó a cabo un ensayo de tiempo de adición con el compuesto que mejor actividad anti-EV71 mostraba, el derivado de tirosina **9** (Figura 7). En dicho ensayo, se emplearon como compuestos de referencia el pirodávir, un inhibidor de entrada que se une a la cápsida viral,¹⁵ y rupintrivir, un inhibidor de proteasa 3C^{16,17} que actúa en etapas tardías del ciclo replicativo.

Si un compuesto inhibe la infección viral en una etapa temprana del ciclo replicativo, la adición de dicho compuesto al cultivo no puede demorarse mucho sin que se pierda actividad. Sin embargo, si un compuesto actúa en una etapa tardía del ciclo replicativo, la adición del compuesto puede demorarse sin perder actividad.

Tal y como se observa en la Figura 7, el derivado de tirosina **9** debe añadirse al cultivo antes (-2 horas en la gráfica) o en el momento (0 horas) de la infección para que no aparezca ARN viral (ausencia de barras), mientras que si se añade transcurridas las dos primeras horas de la infección ya se empieza a observar la aparición de ARN viral (barras blancas). Este resultado confirma que el compuesto **9** actúa en etapas tempranas del ciclo replicativo de EV71, al igual que el pirodávir (barras negras). Por el contrario, el inhibidor de proteasa rupintrivir, pierde su actividad cuando se añade a las 6 horas después de la infección (barras grises), lo que está de acuerdo con su mecanismo de acción.

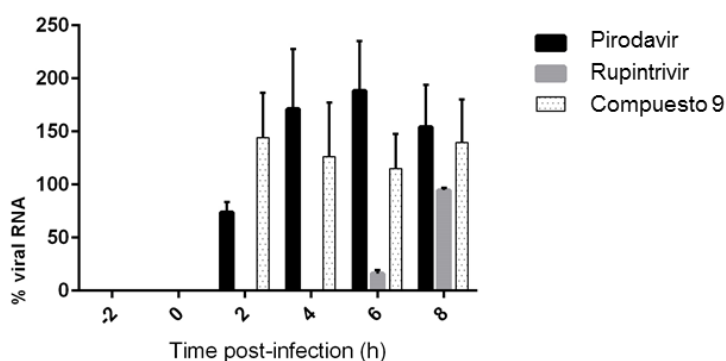


Figura 7. Ensayo tiempo de adición llevado a cabo con el compuesto **9**

En la literatura existen numerosos ejemplos de compuestos aniónicos que interaccionan con la carga positiva de los residuos que se encuentran en la proteína VP1 de la cápsida

viral.^{18,19} En base a ello, se podría postular que el carácter polianiónico de nuestros compuestos podría favorecer la interacción con aminoácidos situados en la zona positiva de la proteína VP1, impidiendo de este modo que el virus EV71 se una a su receptor celular y en consecuencia, la entrada del virus en la célula y su posterior replicación.

Los compuestos con mejor actividad (**9** y **23**) se evaluaron, además, frente a cepas clínicas aisladas de pacientes representativas de diferentes sub-genogrupos (A, B2, B5, C2 y C4). En este ensayo, el prototipo **AL-385** fue incluido como referencia¹ (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de actividad frente a EV71 en cepas clínicas

EV71 Genogrupo	Cepas virales	CE ₅₀ (nM) ^a		
		AL-385	9	23
A	BrCr	285 ± 70	390 ± 140	3560 ± 1620
B2	11316	0.4 ± 0.0	6.7 ± 3.2	160 ± 10
B5	TW/96016/08	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.1	51 ± 18
	TW/70902/08	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.3	66 ± 11
C2	H08300 461#812	1.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4	180 ± 10
C4	TW/1956/05	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	58 ± 6
	TW/2429/04	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1	59 ± 18

^a Todos los valores están en nanomolar (nM) y son obtenidos de experimentos múltiples (>2) e independientes (>1).

Los compuestos ensayados no inducen la muerte celular y no causan efectos adversos en la célula huésped ni en su morfología

Al igual que se observó para el prototipo **AL-385**, el derivado de tirosina **9** (el más activo frente a EV71) mostró una potente actividad, en el rango nanomolar, frente a las diferentes cepas clínicas. Aunque el compuesto **23** resultó menos activo que **9**, también se observa un aumento de actividad en las cepas clínicas con respecto a las cepas de laboratorio (BrCr) para dicho compuesto. Sin embargo, el compuesto de referencia pirodavir, ensayado frente a las mismas cepas clínicas, no mostró cambios significativos con respecto a las cepas de laboratorio (datos no incluidos).

En la actualidad se están llevando a cabo estudios que nos permitan explicar el mecanismo de acción de estos compuestos y la diferencia de actividad observada entre las cepas de laboratorio y las cepas clínicas aisladas de pacientes.

CONCLUSIONES

A partir del compuesto prototipo **AL-385**, con un esqueleto central de pentaeritritol, 4 amplificadores trivalentes y 12 triptófanos con sus grupos ácidos carboxílicos libres en la periferia, se han llevado a cabo modificaciones que han consistido en la sustitución del triptófano por otros aminoácidos, tanto aromáticos (fenilalanina y tirosina) como no aromáticos (alanina), triptamina (análogo de Trp sin grupo ácido) y *N*-Metil Trp.

A la vista de los resultados, podemos concluir que:

- La nueva metodología sintética puesta a punto en este capítulo, basada en una aproximación convergente, condujo a mejor rendimiento del compuesto prototipo **AL-385** que la aproximación divergente empleada hasta el momento. Además, la aproximación convergente hizo posible la preparación de los derivados de triptamina **10** y *N*-Metil Trp **23**, cuya síntesis mediante la aproximación divergente no había sido posible o resultó poco eficaz.
- La naturaleza de la cadena lateral del aminoácido es importante para la actividad frente a VIH y EV71. Así, los mejores datos de actividad se obtuvieron con el prototipo **AL-385** y el derivado de tirosina **9**, con anillos de indol y fenol respectivamente en su cadena lateral.
- El derivado de triptamina **10** resultó inactivo tanto frente a VIH como frente a EV71, lo que demuestra que los grupos ácidos carboxílicos libres en la periferia son cruciales para la actividad.
- El derivado *N*-Metilado de Trp **23**, resultó más activo que el prototipo frente a VIH y 3 veces menos activo frente a EV71. Estos resultados sugieren que el NH del anillo de indol no es crucial para la actividad frente a VIH mientras que si lo es para EV71.
- Estudios de SPR llevados a cabo con los compuestos más activos frente a VIH, **9** y **23**, revelaron que ambos compuestos interaccionan con las glicoproteínas gp120 y gp41 de la cubierta viral del VIH, siendo el derivado **23** el que mejor interacción mostró. Las constantes de afinidad para los complejos **23**-gp120 ($K_D = 1.53 \mu\text{M}$) y **23**-gp41 ($K_D = 3.40 \mu\text{M}$), resultaron ser mejores que las observadas para el prototipo (K_D **AL-385**-gp120 = $6.7 \mu\text{M}$ y K_D **AL-385**-gp41 = $18 \mu\text{M}$).
- Ensayos de tiempo de adición llevados a cabo con el derivado de tirosina **9**, mostraron que dicho compuesto actúa en fases tempranas del ciclo replicativo de EV71. Este hecho, hace de ambos compuestos candidatos idóneos para su uso como microbicidas en los que existe un gran interés, especialmente en países en vías de desarrollo donde se concentra el 90% de las infecciones por VIH y donde el acceso a las terapias retrovirales convencionales es muy limitado.^{18,19}

- Al igual que se observó para el prototipo, el derivado de tirosina **9**, mostró actividad anti-EV71 en rango nanomolar frente a cepas clínicas aisladas de pacientes, lo que significa un aumento de más de 1000 veces en la actividad con respecto a la observada en cepas de laboratorio. Este hallazgo indica que estos compuestos pueden ser buenos candidatos para un futuro tratamiento terapéutico o profiláctico de la infección causada por EV71.

PARTE EXPERIMENTAL

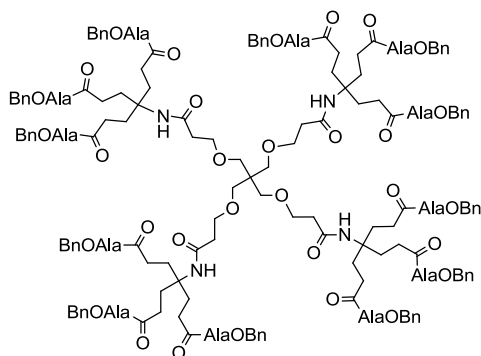
Los esquemas y las partes experimentales de los capítulos que se describen en la presente Tesis Doctoral se escriben en Inglés para facilitar la escritura de los artículos correspondientes.

Synthesis of dendrimers by divergent approach

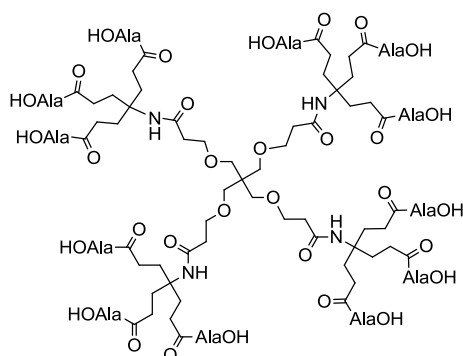
General coupling procedure for the synthesis of dendrimers 3, 5, 7 and 10. The *tert*-butyl derivative **1** was deprotected to give the pentaerythritol derivative **2** as it was previously described.¹ To a solution containing **2** (1.0 mmol) in DMF (20 mL), HATU (1.2 eq for each carboxylic acid group), the corresponding OMe- or OBn-protected amino acid or triptamine (1.2 eq for each carboxylic acid group) and DIPEA (2.5 eq for each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C for 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 × 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 × 20 mL), and brine (3 × 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

General procedure for the deprotection of methyl esters. To a solution containing the corresponding methyl ester derivative (1.0 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C (ice-bath), a solution of LiOH·H₂O (2 eq for each methyl ester group) in water (2 mL) was added, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Then 1 N hydrochloric acid aqueous solution was added to reach pH = 2, and volatiles were evaporated to dryness. The residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and washed with H₂O (3 × 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was triturated with diethyl ether to afford the pure deprotected derivatives.

OBn-Alanine dendrimer 3

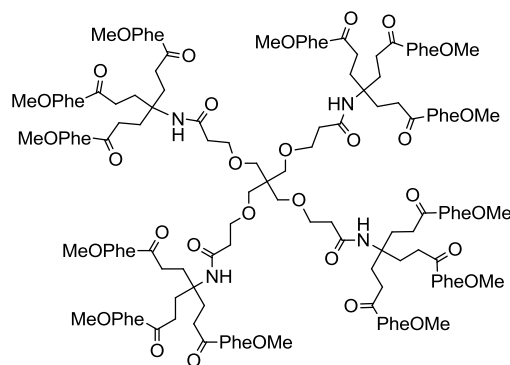


Following the general coupling procedure, compound **2** (100 mg, 0.075 mmol), HATU (407 mg, 1.07 mmol), H-(L)-AlaOBn·HCl (230.8 mg, 1.07 mmol) and DIPEA (0.4 mL, 2.24 mmol) in DMF (20 mL) afforded 61 mg (25%) of **3** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.39–7.27 (m, 60H, Ar), 7.20 (d, *J* = 7.1 Hz, 12H, NHCO), 5.19–5.02 (m, 24H, CH₂Bn), 4.51 (m, 12H, α-CHAla), 3.67–3.49 (m, 8H, OCH₂), 3.37–3.26 (m, 8H, OCH₂), 2.38–2.15 (m, 32H, CH₂), 2.11–1.94 (m, 24H, CH₂), 1.34 (d, *J* = 7.2 Hz, 36H, CH₃). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 7.792 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₁₇₇H₂₂₀N₁₆O₄₄ 3273.5469; found 3273.5306.

Alanine dendrimer 4

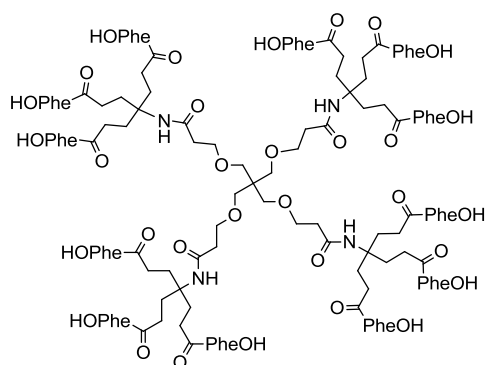
A solution of the compound **3** (124.5 mg, 0.038 mmol) in THF/methanol (1:1, 20 mL) containing Pd (10% on C; 30 wt.%) was hydrogenated in a Parr hydrogenator with pressure 2.03 atm (30 psi) at room temperature for 6 h. The residue was filtrated through a Whatman® filter paper 42 and the solvent was removed under reduced pressure to give 83 mg (quant) of **4** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

δ : 8.31–8.06 (m, 12H, NHCO), 7.33–7.16 (m, 4H, NHCO), 4.30–4.18 (m, 12H, α -CHAla), 3.58–3.22 (m, 16H, OCH₂), 2.02–1.78 (m, 56H, CH₂), 1.22 (bs, 36H, CH₃). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.9, 173.9, 172.8, 172.6, 170.2, 69.7, 68.3, 65.6, 57.4, 52.5, 48.2, 48.1, 37.3, 30.6, 29.8, 17.8, 17.6, 15.9. HPLC [gradient: A:B, 2-100% of A in 10 min]: 7.396 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₉₃H₁₄₈N₁₆O₄₄ 2192.9835; found 2192.9849.

OMe-Phenylalanine dendrimer (5)

Following the general coupling procedure, compound **2** (150 mg, 0.11 mmol), HATU (602 mg, 1.58 mmol), H-(L)-PheOMe-HCl (341 mg, 1.58 mmol) and DIPEA (0.57 mL, 3.30 mmol) in DMF (20 mL) afforded 57 mg (15%) of **5** as an amorphous yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.04–7.21 (m, 60H, Ar), 4.73–4.62 (m, 12H, α -CHPh), 3.56 (s, 36H, OCH₃), 3.51–3.42 (m, 8H, OCH₂), 3.21–3.08 (m, 8H, OCH₂), 3.04–2.83

(m, 24H, β -CH₂Ph), 2.20–2.15 (m, 8H, CH₂), 2.09–1.99 (m, 24H, CH₂), 1.87–1.73 (m, 24H, CH₂). HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₇₇H₂₂₀N₁₆O₄₄ 3273.54693; found 3273.55966.

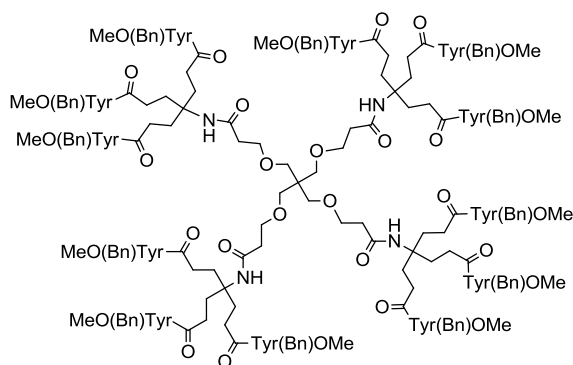
Phenylalanine dendrimer (6)

Following the general procedure for deprotection of the methyl esters, compound **5** (57 mg, 0.0165 mmol) gave 54.2 mg (quant) of **6** as amorphous white solid. ^1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 8.91 (d, J = 8.1 Hz, 12H, NH), 8.04–7.93 (m, 60H, Ar), 5.21–5.17 (m, 12H, α -CHPh), 4.29–4.25 (m, 8H, OCH₂), 4.10 (bs, 8H, OCH₂), 3.82 (dd, J = 13.8 and 5.1 Hz, 12H, β -CH₂Ph), 3.63 (dd, J = 13.7, 9.2 Hz, 12H, β -CH₂Ph), 3.12–3.06 (m, 8H, CH₂), 2.76–2.70 (m, 24H,

CH₂), 2.50–2.38 (m, 24H, CH₂). ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 174.4, 173.4, 170.5, 163.6,

138.9, 130.3, 129.4, 127.6, 70.0, 69.1, 57.8, 54.77, 45.8, 38.1, 31.3, 30.6. HPLC [gradient: A:B, 2-30% of A in 20 min]: 3.94 min. HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₆₅H₁₉₆N₁₆O₄₄ 3105.35913; found 3105.36184.

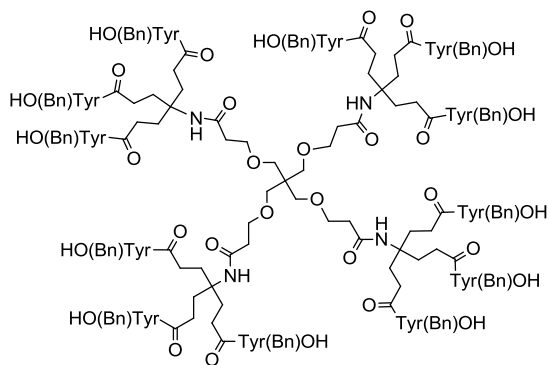
OMe-(Bn)Tyrosine dendrimer (7)



Following the general coupling procedure, compound **2** (100 mg, 0.075 mmol), HATU (408.3 mg, 1.07 mmol), H-(L)-Tyr(Bn)OMe·HCl (345.4 mg, 1.07 mmol) and DIPEA (0.37 mL, 2.16 mmol) in DMF (20 mL) afforded 90 mg (23%) of **7** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.39–7.26 (m, 53H, Ar), 7.08–6.98 (m, 32H, Ar), 6.90–6.79 (m, 24H, Ar), 4.5

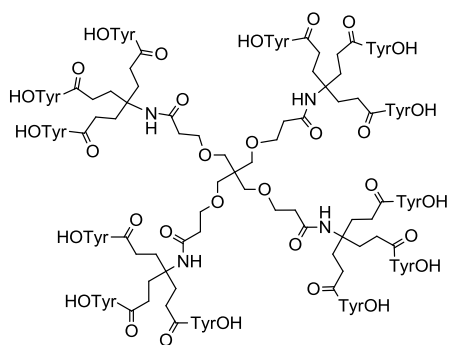
(bs, 24H, CH₂Bn), 4.72–4.66 (m, 12H, α-CHTyr), 3.63–3.53 (m, 44H, OCH₂ and OCH₃), 3.29–3.18 (m, 8H, OCH₂), 3.02–2.80 (m, 24H, β-CH₂Tyr), 2.30–2.25 (m, 8H, CH₂), 2.19–2.15 (m, 24H, CH₂), 1.99–1.92 (m, 24H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 60-100% of A in 10 min]: 9.348 min. HRMS (ESI⁺) m/z: calculated for C₂₆₁H₂₉₂N₁₆O₅₆ 4546.0493; found 4546.0593.

(Bn)Tyrosine dendrimer 8



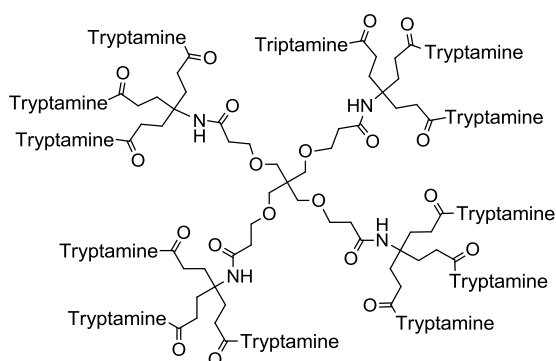
Following the general procedure for deprotection of the methyl esters, compound **7** (162 mg, 0.036 mmol) gave 155 mg (quant) of **8** as an amorphous white solid. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ: 7.35–7.17 (m, 48H, Ar), 7.09–7.00 (m, 24H, Ar), 6.85–6.71 (m, 24H, Ar), 4.86 (s, 24H, CH₂Bn), 4.66–4.62 (m, 12H, α-CHTyr), 3.54–3.42 (m, 8H, OCH₂), 3.20–2.72 (m, 32H, OCH₂ and β-CH₂Tyr), 2.32–2.03 (m, 32H, CH₂),

1.95–1.69 (m, 24H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 13.213 min. HRMS (ESI⁺) m/z: calculated for C₁₆₅H₁₉₆N₁₆O₅₆ 4377.8615; found 4377.8548.

Tyrosine dendrimer (9)

A solution of the compound **8** (150 mg, 0.034 mmol) in THF/methanol (1:1, 20 mL) containing Pd (10% on C; 30 wt.%) was hydrogenated in balloon at 30 °C overnight. The residue was filtrate through a Whatman® filter paper 42 and the solvent was removed under reduced pressure to give 112 mg (quant) of **9** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.04 (d, J = 7.8 Hz, 12H, NHCO), 6.99 (d, J = 8.0 Hz,

24H, Ar), 6.65 (d, J = 7.9 Hz, 24H, Ar), 4.31 (q, J = 7.4 Hz, 12H, α -CHTyr), 3.54–3.46 (m, 8H, OCH₂), 3.34–3.22 (m, 8H, OCH₂), 2.93–2.70 (m, 24H, β -CH₂Tyr), 2.37–2.30 (m, 8H, CH₂), 2.02–1.98 (m, 24H, CH₂), 1.77–1.66 (m, 24H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 173.8, 172.6, 169.8, 156.3, 130.5, 128.2, 115.45, 69.7, 68.3, 57.1, 54.6, 49.1, 45.1, 37.1, 36.7, 30.6, 29.9. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.14 min. HRMS HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₁₆₅H₁₉₆N₁₆O₅₆ 3297.2981; found 3297.2855.

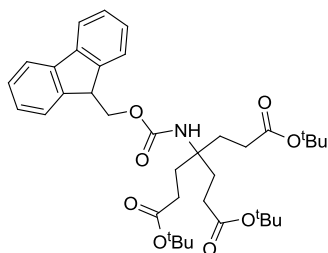
Tryptamine dendrimer (10)

Following the general coupling procedure, compound **2** (0.30 g, 0.21 mmol), HATU (1.186 g, 3.02 mmol), triptamine (0.484 g, 3.02 mmol) and DIPEA (1.09 mL, 6.3 mmol) in DMF (20 mL) afforded 60 mg (5%) of **10** as amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.76 (bs, 12H, NH-1^otryptamine), 7.94–7.88 (m, 12H, NHCO), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 12H, Ar), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 12H, Ar),

7.11 (d, J = 2.4 Hz, 12H, Ar), 7.06–7.00 (m, 12H, Ar), 6.97–6.92 (m, 12H, Ar), 3.59–3.50 (m, 8H, OCH₂), 3.33–3.25 (m, 24H, CH₂), 2.80 (t, J = 7.5 Hz, 24H, CH₂), 2.37–2.31 (m, 8H, CH₂), 2.10–2.02 (m, 24H, CH₂), 1.92–1.83 (m, 24H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.6, 170.1, 136.7, 127.7, 123.0, 121.3, 118.7, 118.7, 112.4, 111.8, 69.4, 68.2, 57.4, 45.3, 37.2, 30.7, 30.2, 25.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.09 min. HRMS (ESI⁺) m/z calculated for C₁₇₇H₂₀₈N₂₈O₂₀ 3045.6120; found 3045.6144.

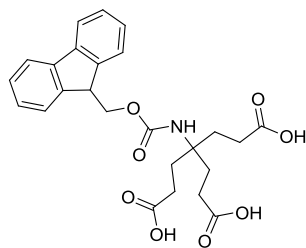
Synthesis of dendrimers by convergent approach

Di-tert-butyl-4-amino-4-[2-(tert-butoxycarbonyl)ethyl]heptanedionate (12)



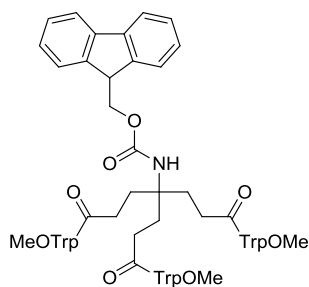
To a solution of the commercially available di-tert-butyl 4-amino-4-[2-(tert-butoxycarbonyl)ethyl]heptanedioate **11** (Behera's amine) (2 g, 4.8 mmol) in dioxane (2 mL/mol), a solution of Na_2CO_3 (1.27 g, 12 mmol) in water (1 mL/mol) was added. The mixture was stirred for 15 minutes and FmocCl (1.86 g, 7.2 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature overnight and then concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate and subsequently washed with citric acid (10%) (3 x 20 mL) and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate (4:1) as eluent to provide 2.80 g (93%) of compound **12** as a colorless oil. Characterization of this compound was consistent with those reported previously.⁸

4-(2-Carboxyethyl)-4-[[[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]heptanedioic acid (13)

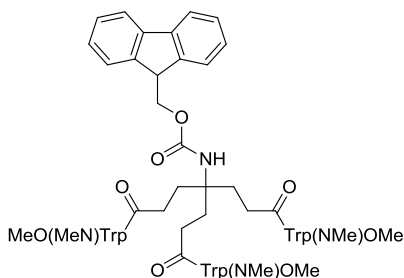


A solution of compound **12** (2.20 g, 3.5 mmol) in formic acid (20 mL) was stirred at 40 °C for 24 h. The resulting residue was concentrated under reduced pressure, and the residue was co-evaporated subsequently with methanol and dichloromethane to provide 1.30 g (quant) of compound **13** as an amorphous white solid. Characterization of this compound was consistent with those reported previously.⁸

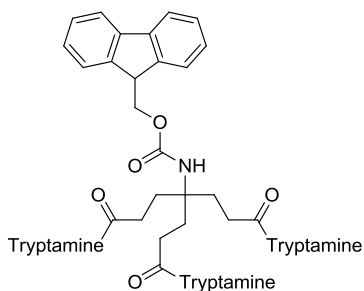
General procedure for the synthesis of Fmoc-amine dendrons 14–16. To a solution containing dendron **13** (1.0 mmol) in DMF (20 mL), HATU (1.2 eq for each carboxylic acid group), the corresponding OMe-protected amino acid or triptamine (1.2 eq for each carboxylic acid group) and DIPEA (2.5 eq for each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO_3 (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

Dendron 14

According to the general procedure, a solution of triacid **13** (0.40 g, 0.85 mmol), HATU (1.167 g, 3.07 mmol), H-(L)-TrpOMe·HCl (0.781 g, 3.07 mmol) and DIPEA (1.5 mL, 8.5 mmol) in DMF (20 mL) afforded 860 mg (95%) of **14** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.53 (bs, 3H, $\text{NH-1}^i\text{Trp}$), 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 7.54 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar), 7.45 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar), 7.47–7.40 (m, 4H, Ar), 7.38–7.19 (m, 6H, Ar), 7.12–6.99 (m, 6H, Ar), 6.85 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H, Ar), 6.28 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, NH), 4.88–4.81 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 4.34 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH_2), 4.11 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH), 3.69 (s, 9H, OCH_3), 3.30 (dd, $J = 14.8, 5.1$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.15 (dd, $J = 14.8, 7.0$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 1.92–1.71 (m, 6H, CH_2), 1.59–1.46 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.704 min.

Dendron 15

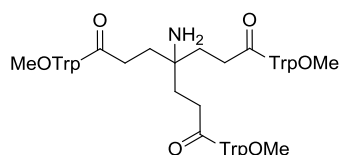
According to the general procedure, a solution of triacid **13** (200 g, 0.43 mmol), HATU (581.7 g, 1.53 mmol), H-(L)-Trp(NMe)OMe· CF_3COOH (0.531g, 1.53 mmol) and DIPEA (0.74 mL, 4.26 mmol) in DMF (20 mL) afforded 460 mg (53%) of **15** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar), 7.60–7.43 (m, 6H, Ar), 7.39–6.97 (m, 12H, Ar), 6.84 (s, 3H, Ar), 6.25–6.14 (m, 3H, NHCO), 4.88–4.82 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 4.42–4.30 (m, 2H, OCH_2), 4.12 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH), 3.73–3.67 (m, 18H, OCH_3 and NCH_3), 3.32–3.17 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.05–1.94 (m, 6H, CH_2), 1.81–1.67 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.541 min.

Dendron 16

According to the general procedure, a solution of triacid **13** (0.50 g, 1.06 mmol), HATU (1.445 g, 3.8 mmol), tryptamine (0.614 g, 3.8 mmol) and DIPEA (1.8 mL, 10.06 mmol) in DMF (20 mL) afforded 633 mg (67%) of **16** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.49 (bs, 3H, $\text{NH-1}^i\text{tryptamine}$), 7.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar), 7.51 (dd, $J = 13.0, 7.4$ Hz, 6H, Ar), 7.35–7.18 (m, 6H, Ar), 7.16–7.00 (m, 6H, Ar), 6.86 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H, Ar), 5.81 (bs, 3H, NHCO), 5.57 (bs, 1H, NHCO), 4.31 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2), 4.10 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH), 3.44 (q, $J = 6.4$ Hz, 6H, NCH_2), 2.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, CH_2), 1.94–1.52 (m, 12H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 7.072 min.

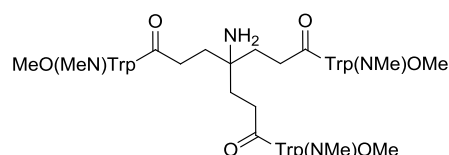
General procedure for the synthesis of amine dendrons 17–19. The corresponding Fmoc-amine dendrons **14–16** were dissolved in a solution of piperidine (20%) in DMF (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature during 4 h. The residue was evaporated to dryness and then was precipitated with dichloromethane/diethyl ether.

Dendron 17



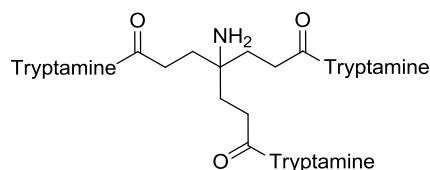
According to the general procedure, dendron **14** (800 mg, 0.75 mmol), afforded 601 mg (95%) of **17** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.85 (bs, 3H, $\text{NH}-1^\circ\text{Trp}$), 8.28 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, NHCO), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, Ar), 7.13 (s, 3H, Ar), 7.07–6.94 (m, 6H, Ar), 4.54–4.40 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.54 (s, 9H, OCH_3), 3.17–2.94 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.15–2.97 (m, 6H, CH_2), 1.47–1.30 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10–100% of A in 10 min]: 4.453 min.

Dendron 18



According to the general procedure, dendron **15** (460 mg, 0.41 mmol), gave 343 mg (94%) of **18** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.29 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, NHCO), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H, Ar), 7.13–6.98 (m, 9H, Ar), 4.46 (q, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.68 (s, 9H, NCH_3), 3.56 (s, 9H, OCH_3), 3.14–2.95 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.12–2.00 (m, 6H, CH_2), 1.45–1.30 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10–100% of A in 10 min]: 5.550 min.

Dendron 19

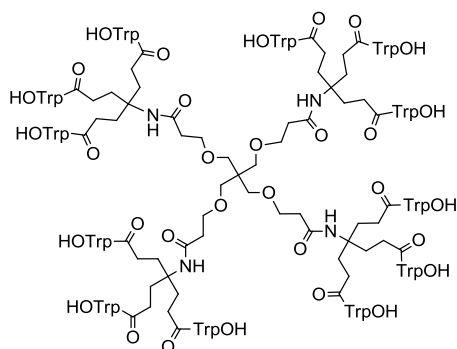


According to the general procedure dendron **16** (630 mg, 0.70 mmol), gave 424 mg (90%) of **19** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.80 (s, 3H, $\text{NH}-1^\circ\text{tryptamine}$), 7.95–7.89 (m, 3H, NHCO), 7.51 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H, Ar), 7.13 (bs, 3H, Ar), 7.07–6.93 (m, 6H, Ar), 3.33–3.22 (m, 6H, NCH_2), 2.79 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H, CH_2), 2.10–2.04 (m, 6H, CH_2), 1.48–1.43 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10–100% of A in 10 min]: 7.397 min.

General procedure for the synthesis of dendrimers 21, 22 and 10 by the convergent approach. To a solution containing the tetrapodal polyacid scaffold **20**⁹ (1.0 mmol) in DMF (20 mL), the corresponding amine dendron **17–19** (1.2 eq for each carboxylic acid group), HATU (1.2 eq for each carboxylic acid group) and DIPEA (2.5 eq for each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 × 20 mL), saturated NaHCO_3 (3 × 20 mL), and brine (3 × 20

mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

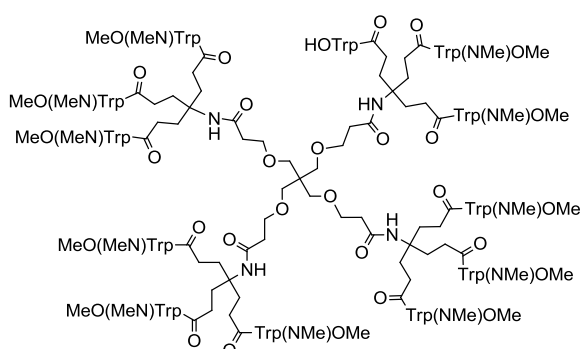
Tryptophan dendrimer AL-385



Following the general coupling procedure poliacid **20** (62 mg, 0.15 mmol), HATU (269.2 mg, 0.708 mmol), the amine dendron **17** (600 g, 0.708 mmol) and DIPEA (0.31 mL, 1.77 mmol) in DMF (20 mL) afforded 166 mg (30%) of OMe-Tryptophan dendrimer **21** as an amorphous white solid. Characterization of this compound was consistent with those reported previously¹. Deprotection of methyl esters of **21** (166

mg, 0.044 mmol) gave 156 mg (quant) of the prototype **AL-385** as an amorphous white solid. Characterization of this compound was consistent with those reported previously.¹

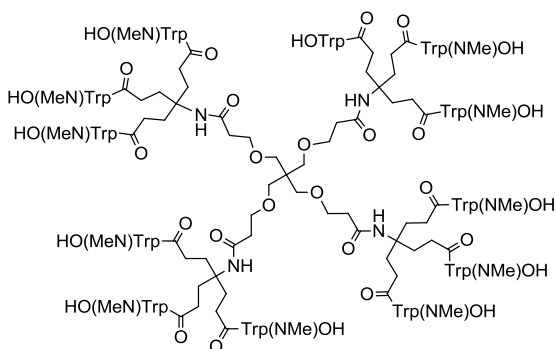
OMe-(NMe)-Tryptophan dendrimer (22)



Following the general coupling procedure poliacid **20** (31 mg, 0.075 mmol), HATU (137 mg, 0.36 mmol), amine **18** (320 mg, 0.36 mmol) and DIPEA (0.13 mL, 0.75) in DMF afforded 77.4 mg (27%) of **22** as an amorphous white solid ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.23 (d, J = 7.4 Hz, 12H, NHCO), 7.47 (d, J = 7.9 Hz, 12H, Ar), 7.31

(d, J = 8.2 Hz, 12H, Ar), 7.14–6.93 (m, 36H, Ar), 4.48 (q, J = 7.1 Hz, 12H, α -CHTrp), 3.65 (s, 36H, NCH₃), 3.53 (s, 44H, OCH₃ and OCH₂), 3.26 (bs, 8H, OCH₂), 3.13–2.98 (m, 24H, β -CH₂Trp), 2.37–2.26 (m, 8H, CH₂), 2.08–2.00 (m, 24H, CH₂), 1.78–1.70 (m, 24H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 7.492 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₂₆₁H₂₉₂N₁₆O₅₆ 3909.8655; found 3909.8816.

(NMe)-Tryptophan dendrimer (23)

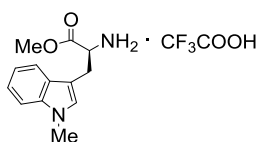


Following the general procedure for deprotection of methyl esters, compound **22** (77 mg, 0.02 mmol) gave 72,3 mg (quant) of **23** as an amorphous white solid ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.87 (d, J = 8.0, 12H, NHCO), 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 12H, Ar), 7.27 (d, J = 8.2 Hz, 12H, Ar), 7.11–6.94 (m, 36H, Ar),

4.46 (q, $J = 7.4$ Hz, 12H, α -CHTrp), 3.61 (s, 36H, NCH₃), 3.51–3.45 (m, 8H, OCH₂), 3.26 (bs, 8H, OCH₂), 3.16–2.96 (m, 24H, β -CH₂Trp), 2.33–2.27 (m, 8H, CH₂), 2.04–1.94 (m, 24H, CH₂), 1.77–1.68 (m, 24H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 173.8, 172.6, 169.8, 137.0, 128.3, 128.1, 121.4, 118.9, 109.9, 69.8, 68.4, 57.2, 53.6, 37.3, 32.6, 32.6, 30.9, 30.1, 27.5. HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 6.731 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₂₀₁H₂₃₂N₂₈O₄₄ 3741.6777; found. 3741.6655.

Triptamine dendrimer (10). Following the general coupling procedure poliacid **20** (83 mg, 0.019 mmol), HATU (360.6 mg, 0.95 mmol), amine **19** (640 mg, 0.95 mmol) and DIPEA (0.8 mL, 4.67 mmol) in DMF afforded 61 mg (16%) of **10** as an amorphous solid of cream color. This compound is identical to those obtained by the above described divergent approach.

H-(L)-Trp(NMe)OMe·CF₃COOH



A cool (0–5 °C) solution of Boc-(L)-TrpOMe (500 mg, 1.57 mmol) in DMF (15 mL), Cs₂CO₃ (614 mg, 1.88 mmol) and methyl iodide (0.15 mL, 2.35 mmol) were added. After 10 min at 0–5 °C the reaction mixture was allowed to reach room temperature and then stirred for 12 h. After evaporation of the solvent to dryness the residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed with brine (3 × 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness to give Boc-(L)-Trp(NMe)OMe that was dissolved in dichloromethane (12 mL) and treated with TFA (3 mL). The resulting solution was stirred at room temperature during 5 h and then dried to dryness to yield 1.23 g (93%) of H-(L)-Trp(NMe)OMe in salt form, that was used for the next reaction without purification. The data of this compound reported in the literature are incomplete. Now missing data (RMN and HPLC) are included. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 7.20–7.11 (m, 2H, Ar), 7.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, Ar), 4.27 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, α -CHTrp), 3.74 (s, 3H, NCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, β -CH₂Trp). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 3.593 min.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donkers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.-J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. Optimization of a class of tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication leads to a selective, specific and low-nanomolar inhibitor of clinical isolates of enterovirus A71. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 5064-5067.
2. Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.R.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roek, J.; Ryder, J.; Smith, P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer J.* **1985**, 17, 117-132.
3. Fréchet, J.M.J.; Hawker, C.J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture: A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7638-7647.
4. O'Leary, B.M.; Szabo, T.; Svenstrup, N.; Schalley, C. A.; Lützen, A.; Schäfer, M. and Rebek, J. Jr. "Flexiball" Toolkit: A Modular Approach to Self-Assembling Capsules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (47), 11519-11533.
5. Fernández, L.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Silber, J.J. and Santo, M. Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, 21, 1079-1085.
6. Zhou, T.; Neubert, H.; Liu, D. Y.; Liu, Z. D.; Ma, Y. M.; Kong, X. L.; Luo, W.; Mark, S. and Hider, R. C. Iron Binding Dendrimers: A Novel Approach for the Treatment of Haemochromatosis. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4171-4182.
7. Carpino, L. A.; Han, G.Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, 22, 3404-3409.
8. Karasugi, K.; Kitagishi, H.; Kano, K. Modification of a diosgenin carrier, HemoCD, with PEGylated dendrons for extension of circulation time in bloodstream. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23 (12), 2365-2376.
9. Flores, A.; Camarasa, M.-J.; Pérez-Pérez, M.-J.; San-Félix, A.; Balzarini, Jan.; Quesada, Ernesto. Multivalent agents containing 1-substituted 2,3,4-trihydroxyphenyl moieties as novel synthetic polyphenols directed against HIV-1. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 5278–5294.
10. Newkome, G.; Weis, C. D. 6,6-bis(Carboxy-2-oxabutyl)-4,8-dioxaundecane-1,11-dicarboxylic acid. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1996**, 28, 242.
11. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Schellenkens, H. and De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS* **1991**, 5 (1), 21-28.

12. Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Arnout, J.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, 85, 6132-6136.
13. Balzarini, J.; Laethem, K.V.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T.; Schols, D. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compounds for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human Immunodeficiency virus. *J. Virol.* **2007**, 81, 362-373.
14. Tesis Doctoral Eva María Rivero Buceta. Polifenoles y dendrímeros de triptófano como inhibidores del proceso de entrada/fusión del VIH. Noviembre **2014**.
15. Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; Van Eemeren, K.; Stokbroekx, R., Janssen, P. A. J. In vitro activity of pirodavis (R 77975), a substituted phenoxy pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**, 36, 100–107.
16. Thibaut, H.J.; Leyssen, P.; Puerstinger, G.; Muigg, A.; Neyts, J.; De Palma, A.M. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Res.* **2011**, 90, 213-217.
17. Tijsma, A.; Franco, D.; Tucker, S.; Hilgenfeld, R.; Froeyen, M.; Leyssen, P.; Neyts, J. The capsid binder vapendavir and the novel protease inhibitor SG85 inhibit enterovirus 71 replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 6990–6992.
18. Nishimura, Y.; Lee, H.; Hafenstein, S.; Kataoka, C.; Wakita, T.; Bergelson, J. M. and Shimizu, H. Enterovirus 71 binding to PSLG-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. *PLOS Pathog.* **2013**, 9 (7), 1-12.
19. Nishimura, Y.; Wakita, T. and Shimizu, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* **2010**, 6 (11), 1-9.

Capítulo 2. Modificaciones en los espaciadores del prototipo AL-385

En el presente capítulo se pretende continuar con las modificaciones en el prototipo **AL-385**.^{1,2}

Hasta el momento se han llevado a cabo modificaciones tanto en el esqueleto central como en la periferia de dicho prototipo³ con el fin de determinar los requisitos estructurales necesarios para la actividad. El siguiente elemento estructural que pretendemos modificar es el espaciador. El trabajo realizado con esta finalidad se recoge a continuación.

En concreto en este capítulo se describe el diseño, síntesis y actividad antiviral de nuevos dendrímeros de triptófano en los que se han sustituido los espaciadores trivalentes presentes en el prototipo **AL-385**, por otros espaciadores con un menor (bivalentes) o mayor (tetravalentes) grado de ramificación que dispondrán de forma diferente los triptófanos de la periferia en el espacio (Figura 1). De este modo, con el espaciador bivalente se disminuiría la congestión estérica de la periferia y la molécula adoptaría una disposición más expandida en la que las ramas están más abiertas y los triptófanos de la periferia más distantes, lo que podría favorecer una mayor interacción con el sitio de unión. Con el espaciador tetravalente se favorecerá la multivalencia, un aspecto estructural que por los estudios SAR llevados a cabo hasta el momento parece ser importante para la actividad anti-VIH y EV71. Como esqueleto central se emplearán los tri- y tetraácidos presentes en los dendrímeros que mejores datos de actividad han mostrado hasta el momento. Para la síntesis de dichos compuestos se emplearán aproximaciones tanto divergentes como convergentes.

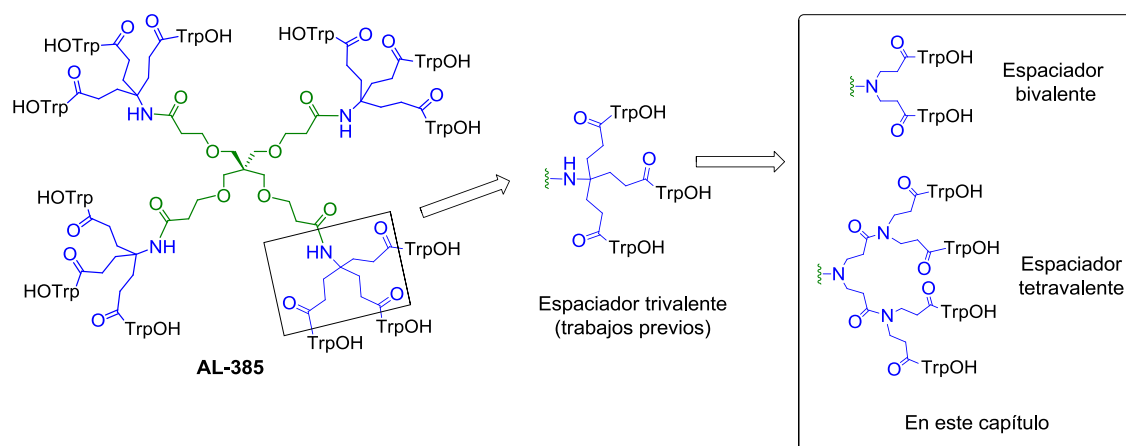


Figura 1. Modificaciones llevadas a cabo en el espaciador del prototipo **AL-385**

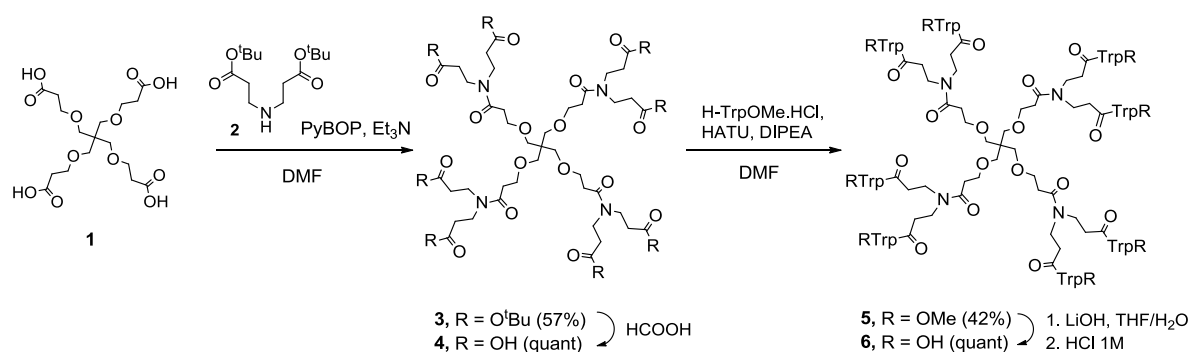
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Síntesis de los dendrímeros con espaciadores divalentes

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de dendrímeros con espaciadores bivalentes en su estructura. Para ello se empleó el compuesto comercial 3,3'-iminopropionato de di-*terc*-butilo **2**. Los grupos ésteres de dicho compuesto, una vez desprotegidos, permitirán la unión de

dos residuos de Trp mientras que el grupo amino libre se unirá a los COOHs de los esqueletos centrales. Para la síntesis se optó por una aproximación divergente en la que los compuestos se construyen desde el núcleo central hacia la periferia.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de **6** con el mismo esqueleto central de pentaeritritol extendido presente en el prototipo **AL-385** (Esquema 1). La síntesis de dicho compuesto comienza a partir del tetraácido **1**, cuya síntesis se llevó a cabo a partir de métodos descritos en la literatura.⁴ El acoplamiento de **1** con la amina **2**, en presencia de PyBOP como agente de acoplamiento y trietilamina como base, condujo al compuesto **3** con un 57% de rendimiento (Esquema 1). La purificación de **3** se realizó por cromatografía de media presión en fase reversa (CH₃CN/H₂O) empleando un equipo Biotage Horizon, que permitió el seguimiento cromatográfico a diferentes longitudes de onda. En este caso, la purificación se monitorizó a 214 y 217 nm, debido a que el compuesto **3** no posee ningún cromóforo en su estructura y por tanto no absorbe a 254 nm.



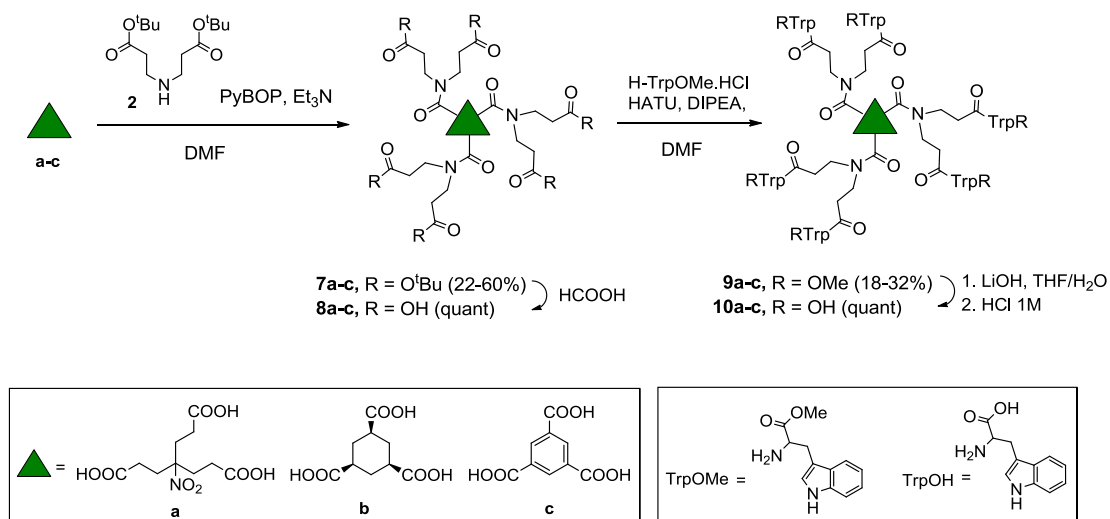
Esquema 1. Síntesis del dendrímero **6** mediante aproximación divergente

La posterior desprotección en medio ácido (ácido fórmico) de los ésteres *tert*-butilílicos presentes en **3**, condujo al poliacido **4** que fue empleado en la etapa siguiente sin necesidad de purificación. La reacción de **4** con el aminoácido H-TrpOMe-HCl en presencia de HATU y DIPEA, condujo al compuesto **5** con un 42% de rendimiento. La saponificación en medio básico (LiOH/H₂O) y posterior acidificación con HCl acuoso, condujo al compuesto deseado **6** con rendimiento cuantitativo.

Merece la pena destacar que el rendimiento global obtenido para el compuesto **6**, empleando la aproximación divergente, es mucho mejor que el obtenido para el prototipo **AL-385** empleando la misma aproximación (24% frente a 4%), lo que sugiere que el impedimento estérico en el espaciador bivalente presente en el compuesto **6** es menor que en el espaciador trivalente presente en el prototipo.

Seguidamente, abordamos la síntesis de los compuestos con esqueletos centrales tripodales **10a-c** (Esquema 2). Para su síntesis se emplearon los triácidos **a-c** ya que tal y como se ha comentado, están presentes en alguno de los compuestos más activos sintetizados

hasta el momento. Dichos triácidos poseen distintos grados de restricción conformacional, siendo ésta mínima para el núcleo central **a**, donde los grupos ácidos están anclados sobre cadenas flexibles, y máxima para el núcleo central **c**, donde los residuos ácidos van anclados sobre un anillo de benceno rígido.



Esquema 2. Síntesis de los dendrímeros **10a-c** con núcleos centrales tripodales y espaciadores divalentes

Así, siguiendo las condiciones de reacción comentadas para el dendrímero **6**, los poliácidos **a**, **b** y **c** se hicieron reaccionar con la amina comercial **2** para obtener, respectivamente, los compuestos **7a** (22%), **7b** (56%) y **7c** (60%) (Esquema 2). La desprotección de los grupos *tert*-butilos presentes en dichos compuestos, seguida de la reacción de acoplamiento con el aminoácido H-TrpOMe·HCl, en presencia de HATU y DIPEA, condujo a los compuestos **9a** (32%), **9b** (18%) y **9c** (29%). La posterior saponificación de los ésteres metílicos en medio básico (LiOH/H₂O), seguido de acidificación (HCl 1M), permitió la obtención, con rendimientos cuantitativo, de los dendrímeros finales **10a-c** con 6 triptófanos en la periferia.

Síntesis de los dedrímeros con espaciadores tetravalentes

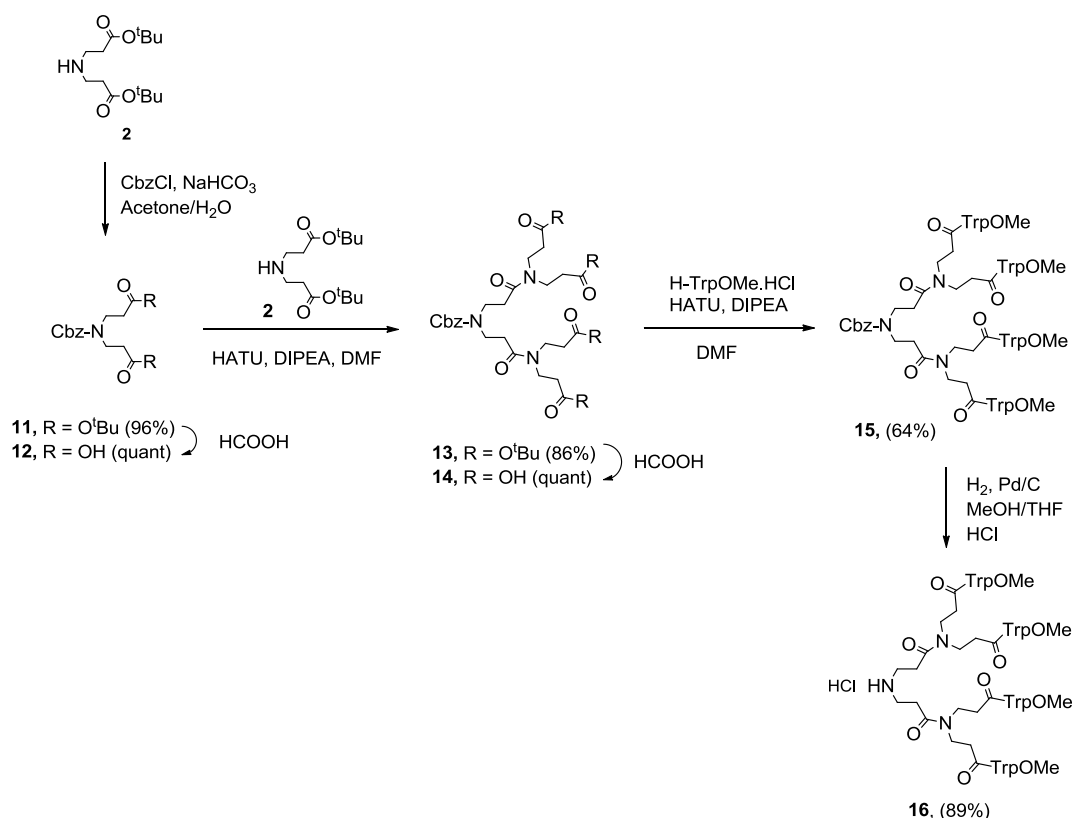
Para la síntesis de los dendrímeros con espaciadores tetravalentes, optamos por una aproximación convergente, en la que los compuestos se construyen desde la superficie hacia el núcleo, ya que el número de enlaces covalentes que se deben formar en un mismo paso de acoplamiento (12 y 18 enlaces) es muy elevado lo que, como vimos en el capítulo anterior, puede ocasionar problemas sintéticos y de purificación.

Para la obtención de los compuestos deseados fue necesario preparar, en primer lugar, el dendrón **16** (Esquema 3), compuesto clave de esta síntesis, en el que están presentes 4

residuos de Trp y un grupo amino libre en su punto focal, que permite la unión a los grupos ácidos presentes en los núcleos centrales mediante la formación de enlaces amida.

La síntesis del dendrón **16** comienza con la protección de la amina **2**, con un grupo benciloxicarbonilo (Cbz), siguiendo condiciones descritas en la literatura (CbzCl, NaHCO₃).⁵ De esta forma se obtuvo el intermedio **11** (96%) con un grupo Cbz-N en su punto focal (Esquema 3). La posterior desprotección de los ésteres *tert*-butilicos presentes en **11** empleando ácido fórmico, condujo al diácido **12**⁵ con rendimiento cuantitativo. La reacción de **12** con la amina **2** en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base, condujo al intermedio **13** con un 86% de rendimiento. Hay que destacar que la activación previa del diácido **12** con HATU durante 45 minutos fue clave para obtener buen rendimiento, ya que con un tiempo de activación menor (5 o 10 minutos) el compuesto **13** se obtuvo con un rendimiento mucho peor (16% frente a 86%).

Seguidamente, la desprotección de **13** en medio ácido, condujo al tetraácido **14** con rendimiento cuantitativo. La reacción de acoplamiento de dicho compuesto con H-TrpOMe·HCl en presencia de HATU y DIPEA, condujo al compuesto **15** (64%), cuya posterior hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C y HCl acuoso al 37%, dio lugar al compuesto deseado **16** (89%) con un grupo amino libre en su punto focal (Esquema 3).

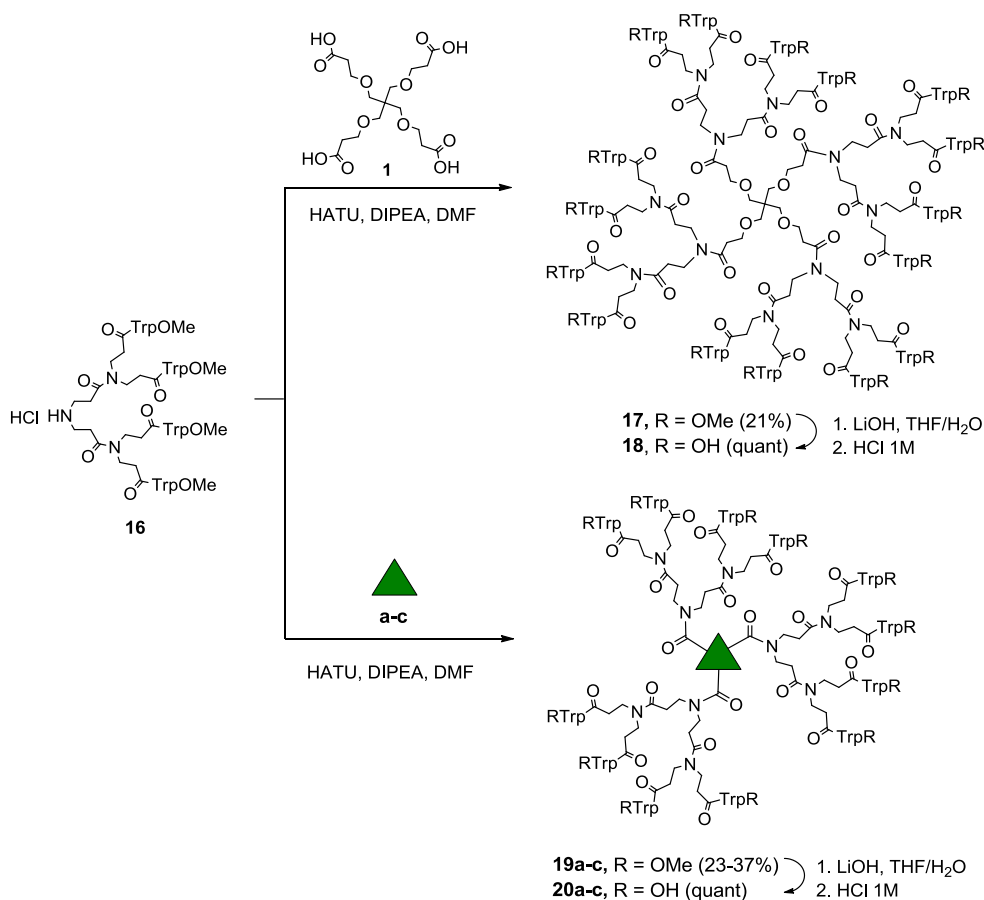


Esquema 3. Síntesis del dendrón tetrapodal **16**

Una vez obtenido el dendrón **16**, se llevaron a cabo las posteriores reacciones de acoplamiento para obtener los dendrímeros deseados. Así, la reacción de **16** con el tetraácido

1, en presencia de HATU y DIPEA, condujo al dendrímero protegido **17** (21%) (Esquema 4), cuya posterior reacción de saponificación en medio básico (LiOH/H₂O), seguido de acidificación (HCl 1M), condujo al compuesto final **18**, con 16 triptófanos con sus grupos ácidos libres en la periferia.

De forma análoga, las reacciones del dendrón **16** con los triácidos **a**, **b** y **c**, utilizando condiciones de acoplamiento similares a las anteriores (HATU y DIPEA), dio lugar a los compuestos protegidos como ésteres metílicos **19a** (27%), **19b** (23%) y **19c** (37%), cuya desprotección empleando LiOH·H₂O como base y posterior acidificación (HCl 1M), proporcionó los dendrímeros totalmente desprotegidos **20a-c** con 12 triptófanos en la periferia (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de los dendrímeros **18** y **20a-c** con espaciadores tetrapodales

Resultados biológicos

Los compuestos sintetizados en este capítulo se evaluaron, en primer lugar, frente a la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando la línea celular MT-4. Además, los compuestos fueron evaluados frente a la replicación del enterovirus 71 (EV71) en cepas de laboratorio (BrCr) empleando células de rhabdomiosarcoma (RD) susceptibles de ser infectadas por EV71. Los procedimientos empleados para la evaluación biológica fueron análogos a los descritos en el capítulo 1.

Adicionalmente, algunos compuestos sintetizados en este capítulo se evaluaron frente a la replicación de un amplio panel de virus.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 para los dendrímeros con espaciadores bivalentes (**6**, **10a-c**), así como para los dendrímeros con espaciadores tetravalentes (**18**, **20a-c**). Además, en esta tabla se han incluido, a efectos comparativos, los datos de actividad del prototipo **AL-385**, con espaciadores trivalentes, y de algunos compuestos patrón que inhiben fases tempranas del ciclo replicativo del virus, tales como dextran sulfato (DS-5000, un inhibidor de adsorción)⁶ y pradimicina A (PRM-A, un inhibidor de entrada con carga negativa que se une a los carbohidratos de la glicoproteína gp120).⁷

Tabla 1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4

Compuesto	VIH-1 CE ₅₀ ^a (μM)	VIH-2 CE ₅₀ ^a (μM)	CC ₅₀ ^b (μM)	Nº Trps
6	1.9 ± 0.2	6.8 ± 5.8	>100	8
10a	10 ± 6	>100	>100	6
10b	5.2 ± 2	>100	>100	6
10c	13.1	ND	>100	6
18	1.3	ND	>100	16
20a	5.23	ND	>100	12
20b	3.99	ND	>100	12
20c	3.32	ND	>100	12
AL-385	2.3 ± 0.30	6.6 ± 7.7	>100	12
DS-5000	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	>20	-
PRM-A	3.3 ± 1.2	5.9 ± 3.7	>100	-

ND: no determinado

^aCE₅₀: concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células MT-4 del efecto citopático de virus

^bCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas

Como se muestra en la tabla, en general no se observan diferencias de actividad significativas entre los dendrímeros con espaciadores bivalentes (**6**, **10a-c**) y los dendrímeros con espaciadores tetravalentes (**18**, **20a-c**). Si bien, los compuestos con espaciadores tetravalentes (CE₅₀ = 1.3–5.23 μM) resultaron algo más activos que los compuestos con espaciadores bivalentes (CE₅₀ = 1.9–13.1 μM). Todos ellos muestran actividad similar a la del

prototipo ($CE_{50} = 2.3 \mu M$), lo que sugiere que la naturaleza del espaciador no desempeña un papel crítico en la actividad anti-VIH.

Merece la pena destacar que los dendrímeros **6** ($CE_{50} = 1.9 \mu M$) y **18** ($CE_{50} = 1.3 \mu M$) con 8 y 16 Trps, respectivamente, en la periferia y un esqueleto central de pentaeritritol, muestran actividades muy similares entre sí y similares también a la actividad del prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 2.3 \mu M$), con el mismo esqueleto central y 12 Trps en la periferia. Estos resultados parecen indicar que para un mismo esqueleto central el número de Trps (6, 8, 12 o 16) de la periferia no afecta de manera significativa en la actividad.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de EV71

Los compuestos sintetizados en este capítulo se evaluaron, además, frente a la replicación del enterovirus 71 en cepas de laboratorio (BrCr). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2, donde se han incluido como referencia los datos de actividad del prototipo **AL-385** y del pirodavir, un inhibidor de entrada capaz de unirse a la cápsida viral.⁸

Tabla 2. Datos de actividad frente a EV71 en células RD

Compuesto	EV71 CE_{50}^a (μM)	EV71 CE_{90}^b (μM)	CC_{50}^c (μM)	Nº Trps
6	27.1	ND	>60.3	8
10a	>82.2	ND	>82.2	6
10b	>85.1	ND	>85.1	6
10c	20.5	ND	>56.9	6
18	0.20 ± 0.02	0.57 ± 0.03	>19.5	16
20a	1.44 ± 0.14	2.67 ± 0.05	>26.3	12
20b	1.51 ± 0.14	2.60 ± 0.19	>26.7	12
20c	0.52 ± 0.03	0.95 ± 0.04	>26.8	12
AL-385	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	24.9	12
Pirodavir	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	>100	-

ND = No determinado.

^a CE_{50} : concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

^b CE_{90} : concentración efectiva 90 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 90% de las células del efecto citopático de virus.

^c CC_{50} : concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

En general, a diferencia de lo observado frente a VIH, los dendrímeros con espaciadores bivalentes (**6**, **10a-c**) resultaron inactivos (**10a**, **10b**) o mostraron actividad anti-EV71 muy próxima a la toxicidad (**6**, **10c**). Esta pérdida de actividad con respecto al prototipo podría

deberse a la presencia de un menor número de residuos de Trp en la periferia, si bien, no se puede descartar la influencia de la diferente posición de los triptófanos en el espacio.

Todos los dendrímeros con espaciadores tetravalentes (**18**, **20a-c**), independientemente del esqueleto central, mostraron actividad significativa similar a la del prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 0.3 \mu M$). Entre ellos, el compuesto **18** ($CE_{50} = 0.20 \mu M$), con un esqueleto tetrapodal de pentaeritritol y **20c** ($CE_{50} = 0.52 \mu M$), con un esqueleto tripodal aromático, fueron los mejores.

Los compuestos con espaciadores tetravalentes (**18**, **20a-c**), fueron ensayados frente a la replicación de un amplio panel de virus tales como: virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2), adenovirus-2, virus corona humano (HCoV-229E), virus vaccinia, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus coxsackie B4, virus sincitial respiratorio humano (VRS), virus influenza A y virus influenza B, virus para-influenza-3, reovirus-1, virus sindbis y virus de la fiebre amarilla. Estos ensayos fueron realizados por el equipo del Prof. Jan Balzarini en el Rega Institute for Medical Research de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

Todos los compuestos ensayados resultaron inactivos a excepción de aquellos con espaciadores tetravalentes (**18**, **20a-c**) que mostraron actividad moderada, pero significativa, frente a los virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), adenovirus-2 y virus corona humano (HCoV-229E). Los datos de actividad se recogen en la Tabla 3, donde se han incluido los datos de actividad del ganciclovir y aciclovir, dos inhibidores de la replicación de los virus herpes simplex tipo 1 y tipo 2 entre otros,^{9,10} y Urtica Dioica (UDA), una lectina natural que actúa como inhibidor de la entrada frente al VIH y el virus de la hepatitis C (HCV) entre otros.¹¹

Tabla 3. Datos de actividad frente a distintos tipos de virus

Compuesto	VHS-2 (G) CE_{50}^a (μM)	Adenovirus-2 CE_{50}^a (μM)	HCoV-229E CE_{50}^a (μM)	CC_{50}^b (μM)
18	5.6	2.7	45	>100
20a	20	20	8.9	>100
20b	8.9	30	40	>100
20c	6.8	6.9	45	>100
Ganciclovir	0.24	ND	ND	>100
Acyclovir	1.2	ND	ND	>250
UDA	ND	ND	1.8	>100

ND = No determinado

^a CE_{50} : concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células HEL del efecto citopático de virus

^b CC_{50} : concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas

Merece la pena destacar la actividad mostrada por los compuestos **18**, **20a-c** frente al virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), un herpes genital que facilita la transmisión del VIH y aumenta su virulencia.¹² En la actualidad, existe un gran interés en la búsqueda de inhibidores

duales de la replicación del VIH y del VHS-2 para su uso como microbicidas con el fin de evitar la transmisión de ambos virus por vía sexual.¹³

Hasta el momento, los dendrímeros sintetizados en nuestro grupo de investigación, entre ellos el prototipo **AL-385**, no habían mostrado actividad frente a la replicación del VHS-2. De ahí el interés de los compuestos con espaciadores tetravalentes descritos en el presente capítulo. Dichos compuestos podrían ser buenos candidatos para el desarrollo de microbicidas capaces de inhibir la replicación de ambos virus.

CONCLUSIONES

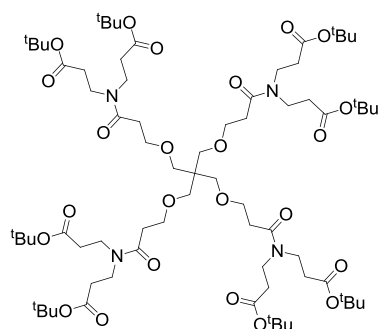
En el trabajo descrito en el presente capítulo, nos propusimos sustituir los espaciadores trivalentes presentes en el prototipo **AL-385** por otros espaciadores con menor (bivalentes) o mayor (tetraivalentes) grado de ramificación que contribuirían a disponer los triptófanos de la periferia de forma diferente en el espacio.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que:

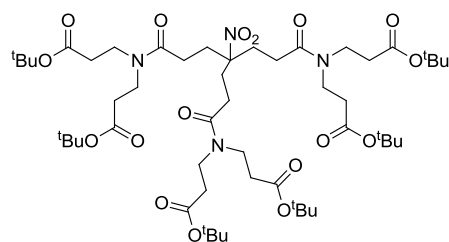
- Frente a la replicación del VIH, los compuestos sintetizados con espaciadores bivalentes y tetraivalentes mostraron actividades similares entre sí y muy parecidas a la del prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 2.3 \mu M$). Este resultado sugiere que la naturaleza del espaciador no desempeña un papel crítico en la actividad anti-VIH. Los compuestos más activos de la serie fueron el dendrímero **6** ($CE_{50} = 1.9 \mu M$), con un esqueleto central de pentaeritritol, espaciadores bivalentes y 8 Trps con los ácidos libres en la periferia, y el dendrímero **18** ($CE_{50} = 1.3 \mu M$), con el mismo esqueleto central, espaciadores tetraivalentes y 16 Trps en la periferia.
- A diferencia de lo observado para el VIH, los dendrímeros con espaciadores bivalentes fueron inactivos frente a EV71, mientras que aquellos que tenían espaciadores tetraivalentes mostraron actividad anti-EV71 muy similar a la del prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 0.3 \mu M$). La pérdida de actividad de los compuestos con espaciadores bivalentes podría ser debida a la presencia de un menor número de Trps en la periferia, si bien no se puede descartar la influencia de la diferente disposición de dichos Trps en el espacio. Los compuestos más activos de la serie fueron **18** ($CE_{50} = 0.2 \mu M$), con un esqueleto tetrapodal de pentaeritritol y **20c** ($CE_{50} = 0.5 \mu M$), con un esqueleto tripodal aromático.
- Los compuestos con espaciadores tetraivalentes se ensayaron frente a un amplio panel de virus, mostrando tan solo actividad frente a la replicación de los virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), adenovirus-2 y el virus corona humano (HCoV-229E). De especial interés es la actividad mostrada frente al VHS-2, un herpes genital que facilita la transmisión del VIH y aumenta su virulencia. Por ello, los compuestos con espaciadores tetraivalentes descritos en el presente capítulo, podrían considerarse buenos candidatos para el desarrollo de microbicidas capaces de inhibir la replicación de ambos virus.

PARTE EXPERIMENTAL

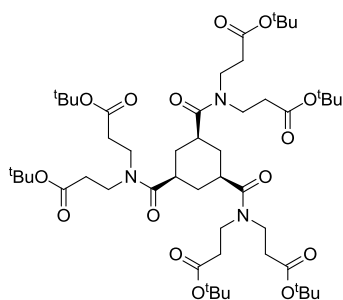
General procedure for the synthesis of dendrimers 3, 7a-c. To a solution containing the corresponding central scaffold **1, a-c** in DMF (20 mL), PyBOP (1.2 eq for each carboxylic acid group), di-*tert*-butyl 3,3'-lminodipropionate **2** (1.2 eq for each carboxylic acid group) and triethylamine (3.4 eq for each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

Dendrimer 3

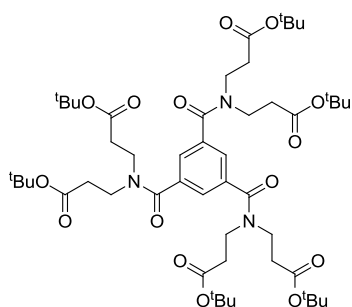
According to the general procedure a solution of the central scaffold **1** (0.20 g, 0.47 mmol), PyBOP (1.18 g, 2.26 mmol), amine **2** (0.64 mL, 2.26 mmol) and triethylamine (0.78 mL, 5.64 mmol) afforded 390 mg (57%) of **3** as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.67–3.55 (m, 16H, NCH₂), 3.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 8H, OCH₂), 3.33 (s, 8H, OCH₂), 2.57 (t, *J* = 6.7 Hz, 8H, CH₂), 2.53–2.44 (m, 16H, CH₂), 1.45–1.37 (m, 72H, CH₃). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.061 min.

Dendrimer 7a

According to the general procedure a solution of the central scaffold **a** (0.20 g, 0.72 mmol), PyBOP (1.35 g, 2.6 mmol), amine **2** (0.73 mL, 2.6 mmol) and triethylamine (1.0 mL, 7.2 mmol) afforded 165.5 mg (22%) of **7a** as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.55–3.46 (m, 12H, NCH₂), 2.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 12H, COCH₂), 2.36–2.23 (m, 12H, CH₂), 1.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 54H, CH₃). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.373 min.

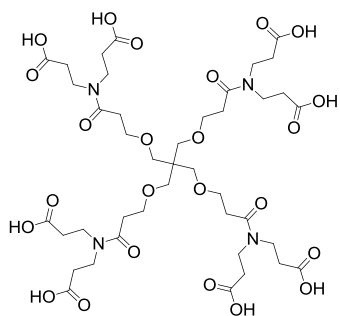
Dendrimer 7b

According to the general procedure a solution of the central scaffold **b** (0.20 g, 0.925 mmol), PyBOP (1.73 g, 3.33 mmol), amine **2** (0.94 mL, 3.33 mmol) and triethylamine (1.28 mL, 9.25 mmol) afforded 508.9 mg (56%) of **7b** as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.60 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, NCH_2), 3.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, NCH_2), 2.78 (t, $J = 12.1$ Hz, 3H, CH_{cycle}), 2.53–2.43 (m, 12H, CH_2), 1.90–1.77 (m, 3H, $\text{CH}_2_{\text{cycle}}$), 1.72–1.64 (m, 3H, $\text{CH}_2_{\text{cycle}}$), 1.43–1.40 (m, 56H, CH_3). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.606 min.

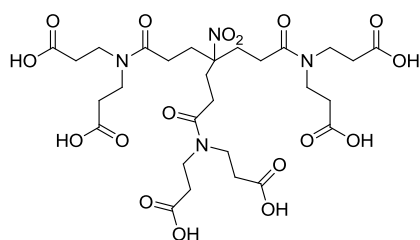
Dendrimer 7c

According to the general procedure a solution of the central scaffold **c** (0.30 g, 1.43 mmol), PyBOP (2.67 g, 5.14 mmol), amine **2** (1.5 mL, 5.14 mmol) and triethylamine (1.48 mL, 10.72 mmol) afforded 837 mg (60%) of **7c** as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (s, 3H, Ar), 3.77–3.53 (m, 12H, NCH_2), 2.69–2.54 (m, 6H, CH_2), 2.49–2.34 (m, 6H, CH_2), 1.50–1.37 (m, 54H, CH_3). HPLC [gradient: A:B, 60-100% of A in 10 min]: 8.394 min.

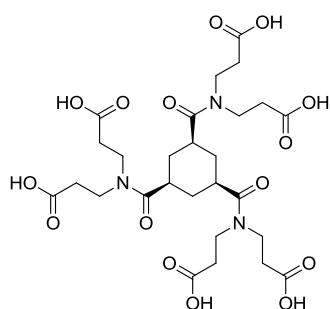
General procedure for the synthesis of carboxylic acids 4, 8a-c. The corresponding protected dendrimers **3** and **7a-c** were dissolved in formic acid and the solution was stirred during 24 h at 30 °C. After cooling, volatiles were evaporated to dryness and co-evaporated successively with methanol and dichloromethane to give the corresponding acids which were used in the next step without purification.

Dendrimer 4

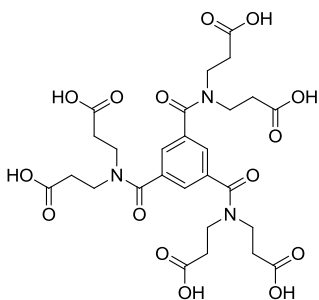
Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **3** (370 mg, 0.256 mmol) gave 250 mg (quant) of **4** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.58–3.49 (m, 16H, NCH_2), 3.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 8H, OCH_2), 3.21 (s, 8H, OCH_2), 2.52–2.49 (m, 16H, CH_2), 2.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 8H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 173.7, 173.4, 171.0, 69.9, 68.3, 45.7, 44.4, 42.3, 34.4, 33.4, 33.1.

Dendrimer 8a

Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **7a** (150 mg, 0.144 mmol) gave 101 mg (quant) of **8a** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.47 (t, J = 7.1 Hz, 6H, NCH $_2$), 3.37 (t, J = 7.4 Hz, 6H, NCH $_2$), 2.47–2.44 (m, 6H, CH $_2$), 2.38 (t, J = 7.4 Hz, 6H, CH $_2$), 2.28–2.21 (m, 6H, CH $_2$), 2.16–2.10 (m, 6H, CH $_2$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.7, 173.5, 171.2, 94.2, 44.03, 42.2, 34.0, 32.9, 31.1, 27.2.

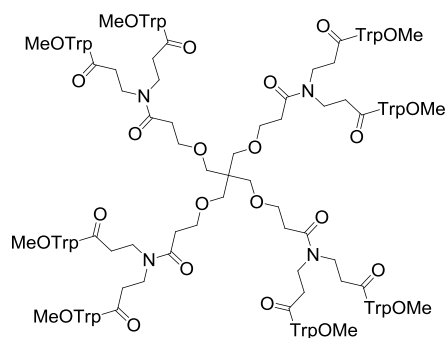
Dendrimer 8b

Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **7b** (250 mg, 0.255 mmol) gave 164 mg (quant) of **8b** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.58–3.49 (m, 6H, NCH $_2$), 3.41–3.31 (m, 6H, NCH $_2$), 2.90–2.73 (m, 3H, CH $_2$ cycle), 2.48–2.42 (m, 6H, CH $_2$), 2.40–2.31 (m, 6H, CH $_2$), 1.51–1.18 (m, 6H, CH $_2$ cycle). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 176.4, 176.3, 174.9, 174.7, 173.5, 173.4, 173.3, 173.2, 44.1, 43.96, 42.1, 42.1, 37.7, 37.6, 35.0, 34.7, 32.8, 32.8, 32.2, 32.2, 31.7, 31.7, 31.6.

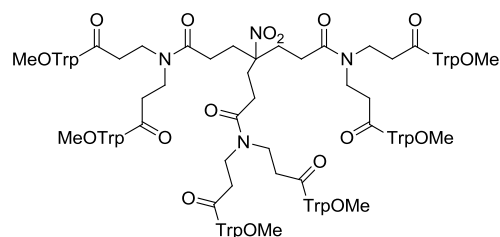
Dendrimer 8c

Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **7c** (500 mg, 0.512 mmol) gave 320 mg (quant) of **8c** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.38–7.34 (m, 3H, Ar), 3.66–3.52 (m, 6H, NCH $_2$), 3.49–3.36 (m, 6H), 2.63–2.52 (m, 6H, CH $_2$), 2.46–2.37 (m, 6H, CH $_2$). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 3.416 min.

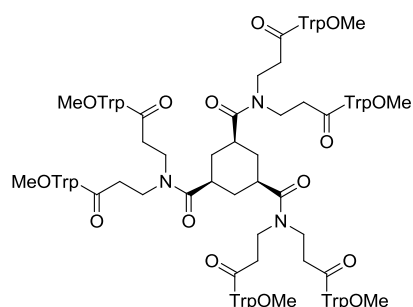
General coupling procedure for the synthesis of OMe protected tryptophan dendrimers 5, 9a-c. To a solution containing the corresponding acid derivative **4** or **8a-c** in DMF (20 mL), H-(L)-TrpOMe·HCl (1.2 eq for each carboxylic acid group), HATU (1.2 eq for each carboxylic acid group) and DIPEA (3.4 eq for each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO $_3$ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na $_2$ SO $_4$, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

Dendrimer 5

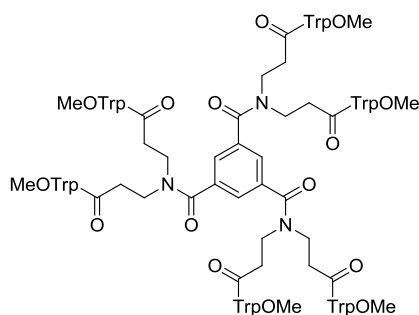
According to the general coupling procedure, a solution of dendrimer **4** (100 mg, 0.10 mmol), HATU (365 mg, 0.96 mmol), H-(L)-TrpOMe·HCl (236 mg, 0.96 mmol) and DIPEA (0.35 mL, 2.0 mmol) afforded 109.4 mg (42%) of **5** as an amorphous solid of color cream. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.17 (bs, 4H, NH- 1^{H} Trp), 9.05 (bs, 4H, NH- 1^{H} Trp), 7.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H, NHCO), 7.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 8H, Ar), 7.26–7.20 (m, 8H, Ar), 7.12–6.97 (m, 16H, Ar), 6.94 (d, $J = 2.3$, 4H, Ar), 6.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H, Ar), 6.74 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, NHCO), 4.90–4.73 (m, 8H, α -CHTrp), 3.73–3.53 (m, 24H, OCH_3), 3.41–3.08 (m, 44H, NCH_2 , OCH_2 and β - CH_2 Trp), 2.96 (bs, 8H, OCH_2), 2.38–1.96 (m, 24H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.443 min.

Dendrimer 9a

According to the general coupling procedure, a solution of dendrimer **8a** (100 mg, 0.142 mmol), HATU (388 mg, 1.02 mmol), H-(L)-TrpOMe·HCl (260 mg, 1.02 mmol) and DIPEA (0.4 mL, 2.13 mmol) afforded 43.6 mg (32%) of **9a** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.97 (s, 6H, NH- 1^{H} Trp), 7.48–7.42 (m, 6H, Ar), 7.30–7.22 (m, 6H, Ar), 7.14–6.96 (m, 15H, Ar and NHCO), 6.95–6.89 (m, 6H, Ar), 6.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H NHCO), 4.89–4.80 (m, 6H, α -CHTrp), 3.60 (s, 9H, OCH_3), 3.62 (s, 9H, OCH_3), 3.32–3.11 (m, 24H, NCH_2 and β - CH_2 Trp), 2.26–1.90 (m, 24H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.810 min.

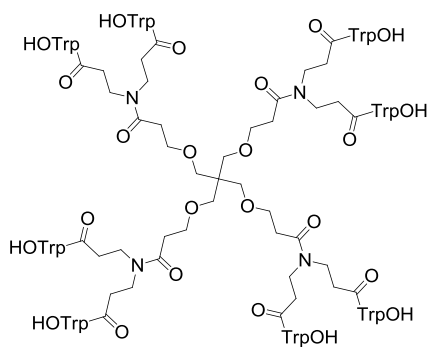
Dendrimer 9b

According to the general coupling procedure, a solution of dendrimer **8b** (100 mg, 0.155 mmol), HATU (426 mg, 1.12 mmol), H-(L)-TrpOMe·HCl (284 mg, 1.12 mmol) and DIPEA (0.41 mL, 2.32 mmol) afforded 65.8 mg (23%) of **9b** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.84–10.78 (m, 6H, NH- 1^{H} Trp), 8.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, NHCO), 8.34 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, NHCO), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.36–7.26 (m, 6H, Ar), 7.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H, Ar), 7.08–6.89 (m, 15H, Ar), 4.55–4.42 (m, 6H, α -CHTrp), 3.53 (bs, 6H, NCH_2), 3.45 (bs, 6H, NCH_2), 3.33–3.24 (m, 18H, OCH_3), 3.14–3.04 (m, 6H, β - CH_2 Trp), 3.03–2.94 (m, 6H, β - CH_2 Trp), 2.88–2.79 (m, 3H, CH_{cycle}), 2.40–2.18 (m, 12H, CH_2), 1.52–1.41 (m, 6H, $\text{CH}_{2\text{cycle}}$). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.880 min.

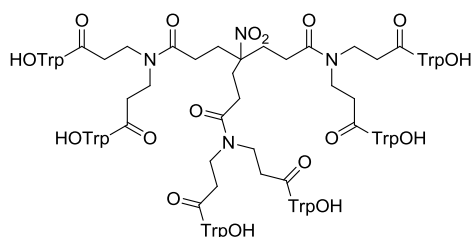
Dendrimer 9c

According to the general coupling procedure, a solution of dendrimer **8c** (250 mg, 0.391 mmol), HATU (1.072 g, 2.82 mmol), H-(L)-TrpOMe-HCl (718.3 mg, 2.82 mmol) and DIPEA (1.02 mL, 5.87 mmol) afforded 206 mg (29%) of **9c** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.72 (bs, 6H, NH- 1^{H} Trp), 8.35–8.19 (m, 6H, NHCO), 7.50–7.42 (m, 6H, Ar), 7.40 (bs, 3H, Ar), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 6H, Ar), 7.15–7.08 (m, 6H, Ar), 7.03 (t, J = 7.5 Hz, 6H, Ar), 6.95 (t, J = 7.6 Hz, 6H, Ar), 4.60–4.54 (m, 6H, α -CHTrp), 3.60–3.43 (m, 12H, NCH $_2$), 3.22 (bs, 18H, OCH $_3$), 3.15–2.96 (m, 12H, β -CH $_2$ Trp), 2.41–2.23 (m, 12H, CH $_2$). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.800 min.

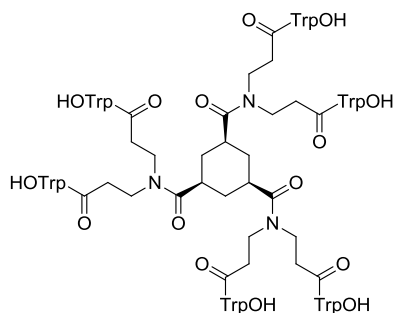
General procedure for the deprotection of the methyl esters. To a solution containing the corresponding methyl ester derivative (1.0 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C (ice-bath), a solution of LiOH·H $_2$ O (2 eq for each methyl ester group) in water (2 mL) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 4–5 h. Then, 1 N hydrochloric acid aqueous solution was added to reach pH = 2 and volatiles were evaporated to dryness. The residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and washed with H $_2$ O (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na $_2$ SO $_4$, filtered and evaporated to dryness. The residue was triturated with diethyl ether to afford the pure deprotected derivatives.

Dendrimer 6

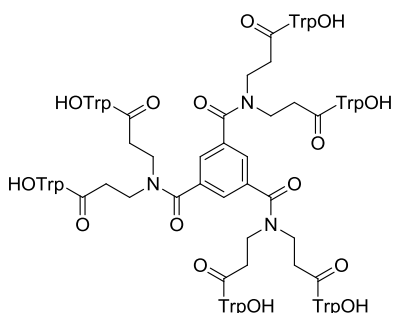
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **5** (95.7 mg, 0.037 mmol) gave 91 mg (quant) of **6** as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.77 (bs, 8H, NH- 1^{H} Trp), 8.27 (d, J = 7.8 Hz, 4H, NHCO), 8.21 (d, J = 7.7 Hz, 4H, NHCO), 7.52–7.56 (m, 8H, Ar), 7.31–7.25 (m, 8H, Ar), 7.08 (dd, J = 9.7, 2.4 Hz, 8H, Ar), 7.03–6.97 (m, 8H, Ar), 6.96–6.90 (m, 8H, Ar), 4.49–4.41 (m, 8H, α -CHTrp), 3.51–3.41 (m, 8H, OCH $_2$), 3.40–3.25 (m, 16H, NCH $_2$), 3.24–3.18 (m, 8H, OCH $_2$), 3.17–3.08 (m, 8H, β -CH $_2$ Trp), 3.02–2.93 (m, 8H, β -CH $_2$ Trp), 2.46–2.40 (m, 8H, CH $_2$), 2.39–2.18 (m, 16H, CH $_2$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 174.3, 174.1, 171.1, 170.8, 170.5, 136.7, 127.9, 127.9, 124.2, 121.5, 119.0, 118.8, 112.0, 110.7, 110.5, 70.0, 68.4, 55.6, 53.8, 49.3, 45.8, 44.6, 42.5, 35.4, 34.1, 33.3, 28.0, 27.8. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.987 min. HRMS (ESI) m/z : calculated for C $_{129}$ H $_{144}$ N $_{20}$ O $_{32}$ 2485.0255; found 2485.0274.

Dendrimer 10a

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **9a** (40 mg, 0.021 mmol) gave 38 mg (quant) of **10a** as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.77 (bs, 6H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.24 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, NHCO), 8.17 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, NHCO), 7.48 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, Ar), 7.33–7.25 (m, 6H, Ar), 7.09 (d, $J = 15.0$ Hz, 6H, Ar), 7.04–6.90 (m, 12H, Ar), 4.51–4.39 (m, 6H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.40–3.22 (m, 12H, NCH_2), 3.16–3.06 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.03–2.91 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.37–2.07 (m, 24H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 174.2, 174.0, 171.2, 171.1, 170.6, 136.7, 127.9, 127.8, 124.3, 121.6, 119.0, 118.9, 112.0, 110.6, 110.3, 65.6, 55.6, 53.7, 44.3, 42.7, 35.1, 34.0, 27.8, 27.2. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.390 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{94}\text{H}_{102}\text{N}_{16}\text{O}_{23}$ 1822.7304; found 1822.7313.

Dendrimer 10b

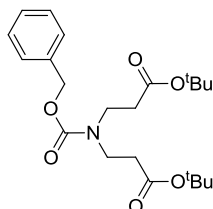
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **9b** (40 mg, 0.022 mmol) gave 38 mg (quant) of **10b** as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.80 (bs, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 10.77 (bs, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.30 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, NHCO), 8.16 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, NHCO), 7.57–7.47 (m, 6H, Ar), 7.37–7.27 (m, 6H, Ar), 7.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H, Ar), 7.09 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H, Ar), 7.07–6.90 (m, 12H, Ar), 4.54 (q, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 4.51–4.41 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.56–3.41 (m, 6H, NCH_2), 3.40–3.24 (m, 6H, NCH_2), 3.18–3.12 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.04–2.96 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.89–2.80 (m, 3H, CH_{cycle}), 2.41–2.21 (m, 12H, CH_2), 1.55–1.41 (m, 6H, $\text{CH}_2_{\text{cycle}}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 174.9, 173.9, 173.8, 171.1, 170.7, 136.9, 128.1, 128.0, 124.2, 124.2, 121.5, 119.0, 118.9, 118.8, 112.0, 110.7, 110.6, 53.7, 44.2, 38.1, 36.0, 34.3, 32.5, 28.1, 27.9. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.240 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{93}\text{H}_{99}\text{N}_{15}\text{O}_{21}$ 1761.7140; found 1761.7129.

Dendrimer 10c

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **9c** (187 mg, 0.101 mmol) gave 170.1 mg (quant) of **10c** as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.80 (s, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 10.76 (s, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, NHCO), 8.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, NHCO), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 7.42 (s, 3H, Ar), 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H, Ar), 7.17 (s, 3H, Ar), 7.08–6.91 (m, 12H, Ar), 4.55–4.44 (m, 6H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.59–3.49 (m, 6H, NCH_2), 3.42–

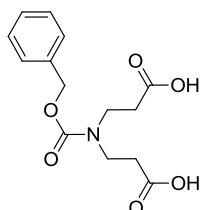
3.27 (m, 6H, NCH₂), 3.24–2.90 (m, 12H, β -CH₂Trp), 2.47–2.38 (m, 6H, CH₂), 2.37–2.21 (m, 6H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.5, 173.2, 170.4, 169.7, 169.3, 137.0, 136.1, 136.0, 127.2, 125.1, 124.9, 123.6, 123.5, 120.9, 118.4, 118.2, 118.0, 111.3, 109.9, 109.6, 53.1, 52.8, 45.3, 41.2, 39.5, 34.4, 34.3, 33.1, 27.2. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.065 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₉₃H₉₃N₁₅O₂₁ 1755.6670; found 1755.6675.

***N*-(Benzyloxycarbonyl) di-*tert*-butyl-imino-3,3'-bispropionate (11)**



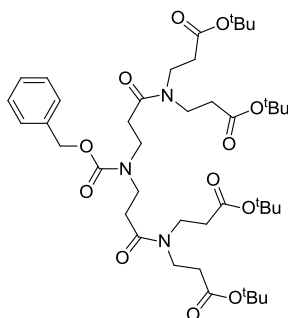
To a solution containing di-*tert*-butyl 3,3'-Iminodipropionate **2** (500 mg, 1.83 mmol) in acetone/H₂O (9:1, 20 mL), NaHCO₃ (2 eq, 307.5 mg, 3.66 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C during 15 minutes and benzyloxycarbonyl chloride, CbzCl, (2 eq, 624.03 mg, 3.66 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature during 18 h and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions 1 N of HCl (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and saturated NH₄Cl (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on flash chromatography using hexane/ethyl acetate (4:1) as eluent to afford 1.43 g (96%) of **11** as colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.37–7.18 (m, 5H, Ar), 5.12–5.04 (m, 2H, BnCH₂), 3.42–3.55 (m, 4H, NCH₂), 2.50–2.36 (m, 4H, CH₂), 1.40–1.34 (m, 18H, CH₃). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.414 min.

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-imino-3,3'-bis(propionic acid) (12)⁵**



Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **11** (1.24 g, 3.04 mmol) gave 897 mg (quant) of **12** as a white solid. The NMR data reported in the literature of this compound is in CDCl₃. Now we reported this in DMSO. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.40–7.26 (m, 5H, Ar), 5.06 (s, 2H, BnCH₂), 3.48–3.38 (m, 4H, NCH₂), 2.47–2.42 (m, 4H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.739 min.

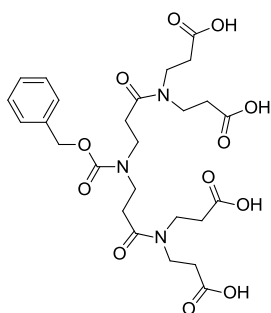
Dendron 13



To a solution containing acid **12** (250 mg, 0.847 mmol) in DMF (15 mL), HATU (772 mg, 2.03 mmol) were added and the mixture was stirred during 45 min. Then the amine **2** (0.58 mL, 2.03 mmol) and DIPEA (0.44 mL, 2.54 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage

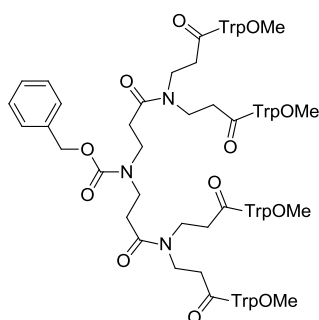
HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent to give 1.67 g (86%) of **13** as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.38–7.28 (m, 5H, Ar), 5.13 (s, 2H, BnCH_2), 3.62–3.44 (m, 12H, NCH_2), 2.70–2.55 (m, 4H, CH_2), 2.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2), 2.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 1.45–1.42 (m, 36H, CH_3). HPLC [gradient: A:B, 60-100% of A in 10 min]: 7.482 min.

Dendron 14

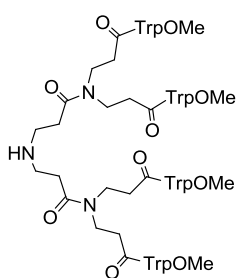


Following the general procedure for the deprotection of *tert*-butyl esters, compound **13** (1.60 g, 1.98 mmol) gave 1.14 g (quant) of **14** as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.37–7.29 (m, 5H, Ar), 5.08–5.02 (m, 2H, BnCH_2), 3.54–3.34 (m, 12H, NCH_2), 2.63–2.54 (m, 4H, CH_2), 2.44–2.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 8H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.503 min.

Dendron 15

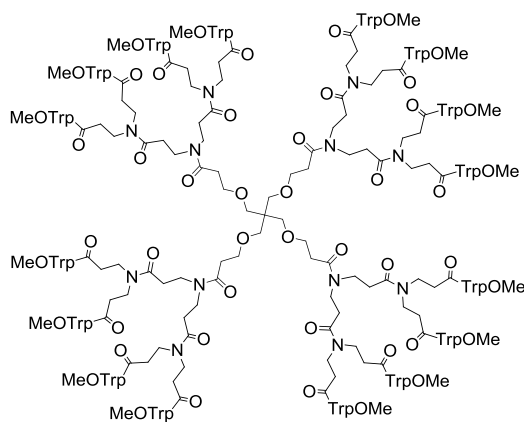


To a solution containing acid **14** (500 mg, 0.86 mmol) in DMF (20 mL), HATU (1.57 g, 4.13 mmol) were added and the mixture was stirred during 30 min. Then H-TrpOMe-HCl (1.05 g, 4.13 mmol) and DIPEA (1.50 mL, 8.60 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO_3 (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent to give 1.06 g (64%) of **15** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.84 (bs, 4H, $\text{NH}-1^i\text{Trp}$), 8.42 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, NHCO), 8.36 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, NHCO), 7.51–7.45 (m, 4H, Ar), 7.36–7.30 (m, 8H, Ar), 7.30–7.23 (m, 1H, Ar), 7.16–7.11 (m, 4H, Ar), 7.09–7.02 (m, 4H, Ar), 7.01–6.95 (m, 4H, Ar), 5.06 (s, 2H, CH_2Bn), 4.58–4.47 (m, 4H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.56 (s, 6H, CH_3), 3.54 (s, 6H, OCH_3), 3.44–3.35 (m, 12H, NCH_2), 3.14 (dd, $J = 14.6$, 6.0 Hz, 4H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.07–2.99 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.58–2.53 (m, 4H, CH_2), 2.39–2.24 (m, 8H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.407 min.

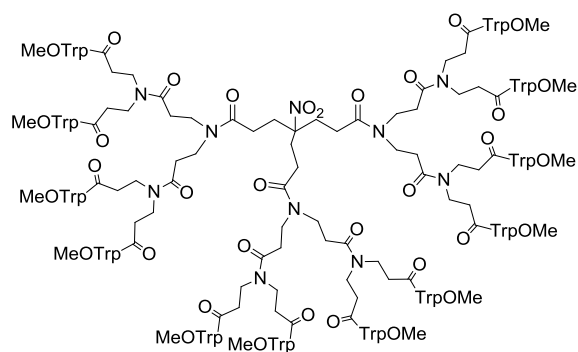
Dendron 16

A solution of the compound **15** (400 mg, 0.30 mmol) in THF/methanol (1:1, 20 mL) containing Pd (10% on C; 30 wt.%) and HCl 37% (24.14 μ L, 0.30 mmol) was hydrogenated in a Parr hydrogenator with pressure 2.03 atm (30 psi) at room temperature for 5 h. The residue was filtrated through a Whatman® filter paper 42 and the solvent was removed under reduced pressure to give 358.5 mg (93% in HPLC) of **16** as an amorphous white solid. The compound **16** was used in the next step without purification. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.70 (s, 4H, NH-1^HTrp), 8.26 (bs, 2H, NHCO), 8.11 (bs, 2H, NHCO), 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 4H, Ar), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 4H, Ar), 7.14 (bs, 4H, Ar), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 4H, Ar), 6.99 (t, J = 7.4 Hz, 4H, Ar), 4.59 (q, J = 7.4 Hz, 4H, α -CHTrp), 3.58 (s, 12H, OCH₃), 3.49–3.36 (m, 8H, NCH₂), 3.25–3.14 (m, 4H, β -CH₂Trp), 3.13–3.03 (m, 8H, β -CH₂Trp and NCH₂), 2.78 (t, J = 6.5 Hz, 4H, CH₂), 2.46–2.31 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.232 min.

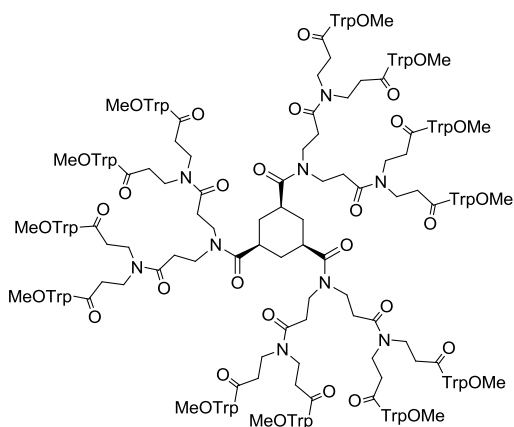
General procedure for the synthesis of dendrimers 17, 19a-c. To a solution containing the corresponding acid **1** or **a-c** (1 eq) in DMF (20 mL), HATU (1.2 eq for each acid group) were added and the mixture was stirred during 30 min. Then the amine **16** (1.2 eq for each acid group) and DIPEA (1.2 eq for each acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

Dendrimer 17

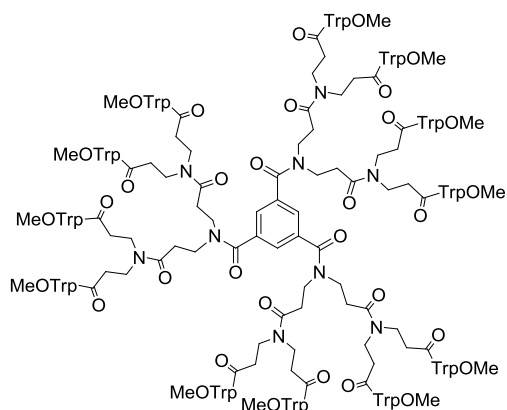
Following the general procedure for the synthesis of dendrimers, tetraacid **1** (19 mg, 0.05 mmol) gave 51.4 mg (21%) of **17** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.77–10.67 (m, 16H, NH-1^HTrp), 8.33–8.19 (m, 16H, NHCO), 7.49–7.40 (m, 16H, Ar), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 16H, Ar), 7.13–7.06 (m, 16H, Ar), 7.09–6.90 (m, 32H, Ar), 4.61–4.46 (m, 16H, α -CHTrp), 3.56–3.46 (m, 48H, OCH₃), 3.28–3.20 (m, 64H NCH₂ and OCH₂), 3.08 (m, 32H, β -CH₂Trp), 2.40–2.24 (m, 56H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 8.847 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₂₈₁H₃₂₈N₄₄O₆₄ 5342.3764; found 5342.3690.

Dendrimer 19a

Following the general procedure for the synthesis of dendrimers, triacid **a** (20 mg, 0.07 mmol) gave 77.3 mg (27%) of **19a** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.80–10.72 (m, 12H, NH- ^1Trp), 8.37–8.26 (m, 12H, NHCO), 7.49–7.40 (m, 12H, Ar), 7.33–7.25 (m, 12H, Ar), 7.13–7.05 (m, 12H, Ar), 7.06–6.88 (m, 24H, Ar), 4.58–4.45 (m, 12H, α -CHTrp), 3.54–3.50 (m, 18H, OCH₃), 3.48 (s, 18H, OCH₃), 3.30–3.24 (m, 36H, NCH₂), 3.16–2.95 (m, 24H, β -CH₂Trp), 2.39–2.21 (m, 48H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 8.545 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₂₀₈H₂₄₀N₃₄O₄₇ 3965.7435; found 3965.7529.

Dendrimer 19b

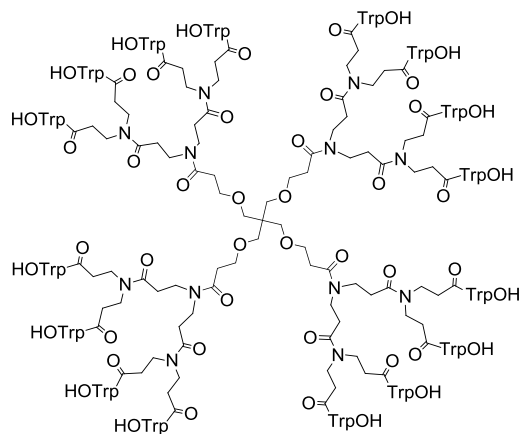
Following the general procedure for the synthesis of dendrimers, triacid **b** (15 mg, 0.07 mmol) gave 62.4 mg (23%) of **19b** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.81–10.73 (m, 12H, NH- ^1Trp), 8.39–8.23 (m, 12H, NHCO), 7.48–7.41 (m, 12H, Ar), 7.30 (d, J = 7.9 Hz, 12H, Ar), 7.13–7.06 (m, 12H, Ar), 7.06–6.89 (m, 24H, Ar), 4.58–4.55 (m, 12H, α -CHTrp), 3.55–3.45 (m, 36H, OCH₃), 3.39–3.30 (m, 24H, NCH₂), 3.28 (bs, 12H, NCH₂), 3.16–2.95 (m, 24H, β -CH₂Trp), 2.94–2.86 (m, 3H, CH₂cycle), 2.63–2.43 (m, 12H, CH₂), 2.41–2.20 (m, 24H, CH₂), 1.70–1.53 (m, 6H, CH₂cycle). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 9.319 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₂₀₇H₂₃₇N₃₃O₄₅ 3904.7271; found 3904.7377.

Dendrimer 19c

Following the general procedure for the synthesis of dendrimers, triacid **c** (14.1 mg, 0.05 mmol) gave 74 mg (37%) of **19c** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.72 (bs, 12H, NH- ^1Trp), 8.37–8.15 (m, 12H, NHCO), 7.50 (bs, 3H, Ar), 7.47–7.38 (m, 12H, Ar), 7.29 (d, J = 7.7 Hz, 12H, Ar), 7.13–7.05 (m, 12H, Ar), 7.06–6.89 (m, 24H, Ar), 4.59–4.45 (m, 12H, α -CHTrp), 3.54–3.45 (m, 36H, OCH₃), 3.27–3.22 (m, 36H, NCH₂), 3.17–

2.94 (m, 24H, β -CH₂Trp), 2.73–2.61 (m, 12H, CH₂), 2.42–2.18 (m, 24H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 40-100% of A in 10 min]: 8.762 min. HRMS (ESI⁺) m/z: calculated for C₂₀₇H₂₃₁N₃₃O₄₅ 3898.6802; found 3898.6877.

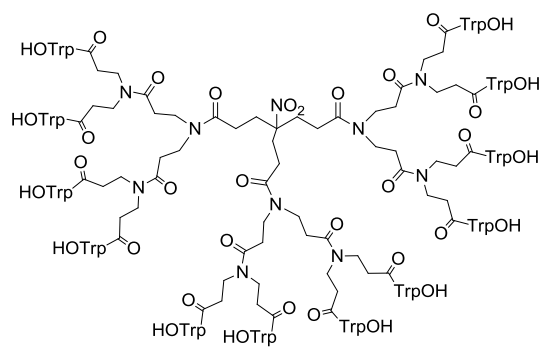
Dendrimer 19



Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above described, dendrimer **17** (100 mg, 0.02 mmol) gave 94.2 mg (quant) of **19** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.73 (bs, 8H, NH-1ⁱTrp), 10.70 (bs, 8H, NH-1ⁱTrp), 8.17 (d, J = 7.7 Hz, 8H, NHCO), 8.11 (d, J = 7.7 Hz, 8H, NHCO), 7.51 (t, J = 7.0 Hz, 16H, Ar), 7.35–7.27 (m, 16H, Ar), 7.13 (bs, 8H, Ar), 7.10 (bs, 8H, Ar), 7.06–6.99 (m, 16H, Ar), 6.98–6.91 (m, 16H, Ar), 4.58–4.46

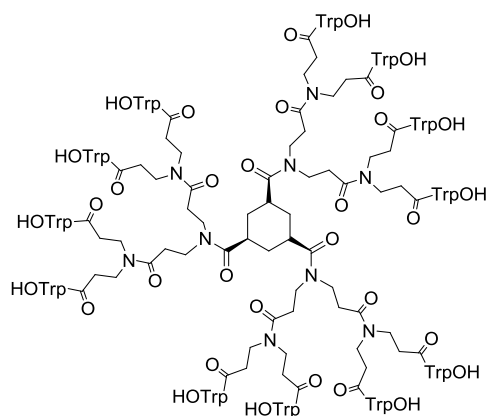
(m, 16H, α -CHTrp), 3.58–3.51 (m, 8H, OCH₂), 3.42–3.29 (m, 56H, NCH₂ and OCH₂), 3.21–3.12 (m, 16H, β -CH₂Trp), 3.07–2.96 (m, 16H, β -CH₂Trp), 2.58–2.53 (m, 8H, CH₂), 2.41–2.23 (m, 48H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.9, 173.8, 170.9, 170.9, 170.4, 136.6, 136.5, 127.8, 127.7, 124.0, 121.3, 118.8, 118.6, 111.8, 110.5, 110.3, 70.2, 68.2, 53.6, 44.2, 42.3, 35.1, 34.0, 33.3, 31.8, 31.0, 27.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.222 min. HRMS (ESI⁺) m/z: calculated for C₂₆₅H₂₉₆N₄₄O₆₄ 5118.1260; found 5118.1211.

Dendrimer 20a

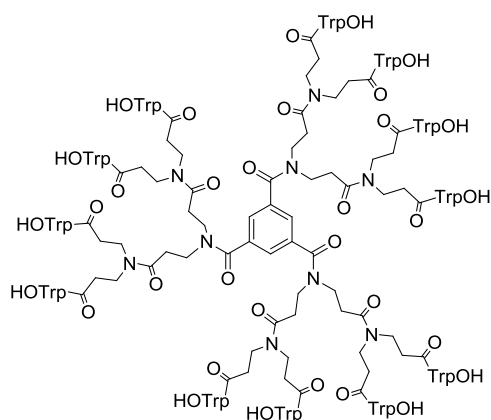


Following the general procedure for the deprotection of the methyl esters, dendrimer **19a** (100 mg, 0.025 mmol) gave 95.1 mg (quant) of **20a** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.71 (s, 6H, NH-1ⁱTrp), 10.74 (s, 6H, NH-1ⁱTrp), 8.21–8.08 (m, 12H, NHCO), 7.55–7.48 (m, 12H, Ar), 7.34–7.28 (m, 12H, Ar), 7.15–7.08 (m, 12H, Ar), 7.06–6.99 (m,

12H, Ar), 6.99–6.91 (m, 12H, Ar), 4.60–4.43 (m, 12H, α -CHTrp), 3.45–3.29 (m, 36H, NCH₂), 3.21–3.11 (m, 12H, β -CH₂Trp), 3.07–2.96 (m, 12H, β -CH₂Trp), 2.41–2.17 (m, 48H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 174.0, 171.1, 170.9, 170.4, 136.6, 136.5, 127.8, 127.7, 124.0, 121.3, 118.8, 118.6, 111.8, 110.5, 110.4, 53.7, 44.3, 42.4, 35.1, 34.0, 27.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.940 min. HRMS (ESI⁺) m/z: calculated for C₁₉₆H₂₁₆N₃₄O₄₇ 3797.5557; found 3797.5557.

Dendrimer 20b

Following the general procedure for the deprotection of the methyl esters, dendrimer **19b** (100 mg, 0.026 mmol) gave 94.5 mg (quant) of **20b** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.80–10.63 (m, 12H, $\text{NH-1}^i\text{Trp}$), 8.23–8.05 (m, 12H, NHCO), 7.56–7.48 (m, 12H, Ar), 7.35–7.27 (m, 12H, Ar), 7.17–7.09 (m, 12H, Ar), 7.07–6.90 (m, 24H, Ar), 4.58–4.45 (m, 12H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.52–3.50 (m, 12H, NCH_2), 3.41–3.26 (m, 24H, NCH_2), 3.23–3.11 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.07–2.96 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.96–2.89 (m, 3H, CH_{cycle}), 2.56–2.54 (m, 6H, CH_2), 2.47–2.43 (m, 6H, CH_2), 2.41–2.20 (m, 24H, CH_2), 1.71–1.53 (m, 6H, CH_2cycle). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 175.0, 174.0, 173.90, 173.8, 171.0, 170.9, 170.5, 170.4, 136.6, 127.8, 127.7, 127.7, 124.0, 121.3, 118.8, 118.7, 111.8, 110.5, 110.3, 53.7, 53.6, 44.3, 42.4, 37.7, 35.1, 34.0, 32.5, 30.9, 27.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.184 min. HRMS (ESI^-) m/z : calculated for $\text{C}_{195}\text{H}_{213}\text{N}_{33}\text{O}_{45}$ 3736.5393; found 3736.5419.

Dendrimer 20c

Following the general procedure for the deprotection of the methyl esters, dendrimer **19c** (100 mg, 0.026 mmol) gave 95.2 mg (quant) of **20c** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.75–10.66 (m, 12H, $\text{NH-1}^i\text{Trp}$), 8.20–8.12 (m, 6H, NHCO), 8.11–8.04 (m, 6H, NHCO), 7.55–7.48 (m, 15H, Ar), 7.34–7.28 (m, 12H, Ar), 7.16–7.08 (m, 12H, Ar), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 12H, Ar), 6.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 12H, Ar), 4.58–4.47 (m, 12H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.64–3.53 (m, 12H, NCH_2), 3.48–3.25 (m, 24H, NCH_2), 3.21–3.12 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.09–2.94 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.71–2.61 (m, 12H, CH_2), 2.43–2.20 (m, 24H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.9, 173.8, 171.0, 170.9, 170.5, 170.0, 169.8, 137.7, 136.6, 128.8, 127.9, 127.8, 127.7, 125.7, 124.0, 121.3, 118.8, 118.7, 118.6, 111.8, 110.5, 110.3, 53.6, 46.1, 44.3, 42.4, 35.1, 34.0, 32.4, 31.7, 27.8, 27.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.016 min. HRMS (ESI^-) m/z : calculated for $\text{C}_{195}\text{H}_{207}\text{N}_{33}\text{O}_{45}$ 3730.4924; found 3730.4875.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivero-Buceta, E.; Doyagüez, E.G.; Colomer, I.; Quesada, E.; Mathys, L.; Noppen, S.; Liekens, S.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; Balzarini, J.; San-Félix, A. Tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication, prevent virus entry and bind to the HIV envelope glycoproteins gp120 and gp41. *Eur. J. Med.Chem.* **2015**, 34-43.
2. Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donkers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.-J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. Optimization of a class of tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication leads to a selective, specific and low-nanomolar inhibitor of clinical isolates of enterovirus A71. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 5064-5067.
3. Martínez-Gualda, B.; Sun, L.; Rivero-Buceta, E.; Flores, A.; Quesada, E.; Balzarini, J.; Noppen, S.; Liekens, S.; Schols, D.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Mirabelli, C.; Camarasa, M.-J.; San-Félix, A. Structure-activity relationship studies on a Trp dendrimer with dual activities against HIV and enterovirus A71. Modifications on the amino acid. *Antiviral Research*, **2017**, 139, 32-40.
4. Flores, A.; Camarasa, M.-J.; Pérez-Pérez, M.-J.; San-Félix, A.; Balzarini, Jan.; Quesada, Ernesto. Multivalent agents containing 1-substituted 2,3,4-trihydroxyphenyl moieties as novel synthetic polyphenols directed against HIV-1. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 5278–5294. b) Newkome, G.; Weis, C. D. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1996**, 28, 242.
5. Fang, L.; Yu, J.; Liu, Y.; Wang, A.; Wang, L. Homogeneous catalysis, heterogeneous recycling: a new family of branched molecules with hydrocarbon or fluorocarbon chains for the Friedländer synthesis of quinoline under solvent-free conditions. *Tetrahedron*, **2013**, 69, 11004-11009.
6. Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Arnout, J.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, 85, 6132-6136.
7. Balzarini, J.; Laethem, K.V.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T.; Schols, D. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compounds for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human Immunodeficiency virus. *J. Virol.* **2007**, 81, 362-373.
8. Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; Van Eemeren, K.; Stokbroekx, R.; Janssen, P. A. J. In vitro activity of pirodavis (R 77975), a substituted phenoxy pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**, 36, 100–107.
9. Croxtall, J. D. Ganciclovir Ophthalmic Gel 0.15% In Acute Herpetic Keratitis (Dendritic Ulcers). *AID Drugs Profile*, **2011**, 71, 603-610.

10. Kern, E. R.; Richards, T. T.; Overall, J. C.; Glasgow, Jr. L. A. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. I. Topical therapy of type 2 and type 1 infections of mice. *Antiviral Research*, **1983**, 3, 253-267.
11. Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research*, **2006**, 71, 237-247.
12. Barnavas, R. V.; Celum, C. Infectious co-factors in HIV-1 transmission Herpes Simplex Virus type-2 and HIV-1: New insights and interventions. *Curr. HIV Res.* **2012**, 10, 228-237.
13. Qiu, M.; Chen, Y.; Song, S.; Song, H.; Chu, Y.; Yuan, Z.; Cheng, Lin, Zheng, D.; Chen, Z.; Wu, Z. Poly(4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid) is an entry inhibitor against both HIV-1 and HSV infections. Potencial as a dual functional microbicide. *Antiviral Research*, **2012**, 96, 138-147.

Capítulo 3. Trímeros y tetrámeros con actividad dual frente a VIH y EV71

El objetivo del trabajo que se describe en el presente capítulo es la síntesis de compuestos activos frente a VIH y EV71, de menor peso molecular que el prototipo **AL-385**. Para ello preparamos los compuestos “truncados” **I** y **II** en los que se eliminó el espaciador y en los que los residuos de triptófano se unieron directamente al esqueleto central (Figura 1). Desafortunadamente, tal y como veremos en el apartado de resultados biológicos, dichos compuestos resultaron inactivos tanto frente a VIH como a EV71. Ante este resultado, decidimos preparar derivados de **I** y **II** con anillos aromáticos sustituidos con grupos funcionales de distinta naturaleza (estructuras **A** y **B**), con la hipótesis de que dichos anillos sustituidos podrían establecer interacciones “extras” con los residuos presentes en el punto de interacción de los compuestos. De esta manera, quizá se podría compensar la pérdida de un número significativo de residuos de triptófano con respecto al prototipo (9 en el caso del compuesto **I** y 8 en el caso del compuesto **II**) y recuperar la actividad antiviral perdida.

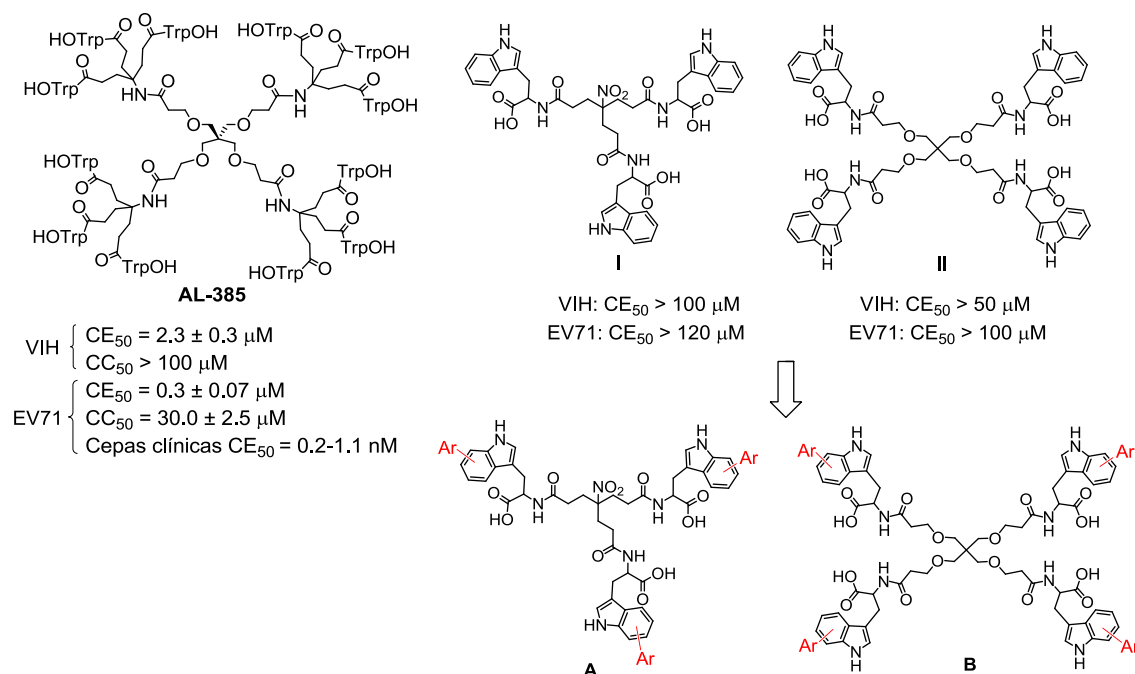


Figura 1. Estructura y actividad de los compuestos **AL-385**, **I**, **II**, **A** y **B**

De especial interés sería la introducción de anillos aromáticos sustituidos con grupos ácidos (COOH) ya que, tal y como vimos en el capítulo 1 de esta memoria, este tipo de anillos parecía ejercer un efecto positivo en la actividad. Dichos anillos se introducirían en las posiciones N1, C2 y C7 del anillo de indol de la cadena lateral de los triptófanos presentes en **I** y **II** ya que, como veremos más adelante, son las que más posibilidades sintéticas ofrecen (Figura 2). Para la arilación en las posiciones C2 y C7 se emplearán reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio. Dichas reacciones habían sido descritas para una única molécula de triptófano^{1,2} por lo que sería necesario adaptar las condiciones de reacción con el fin de modificar simultáneamente los 3 o 4 triptófanos presentes en las

moléculas **I** y **II**. Para la arilación en posición N1 se emplearán reacciones de alquilación convencionales.^{3,4}

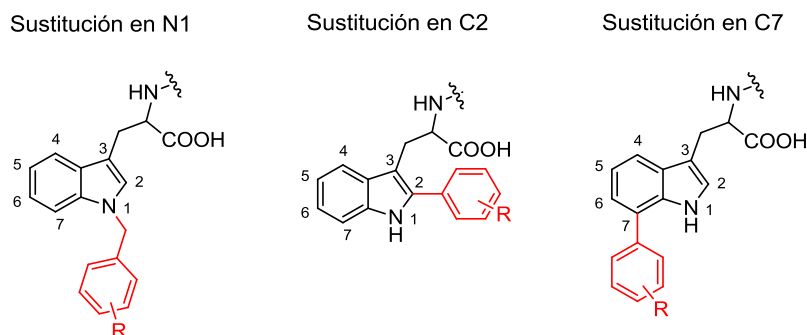


Figura 2 Modificaciones propuestas en las posiciones N1, C2 y C7 del anillo de indol

Antes de pasar a comentar en detalle el procedimiento empleado para la síntesis de los derivados arilados de **I** y **II**, conviene recordar algunos de los aspectos más importantes acerca de la reactividad del triptófano y del anillo de indol presente en la cadena lateral de dicho aminoácido.

El anillo de indol, una “estructura privilegiada” y su reactividad

El indol, es probablemente uno de los heterociclos más abundantes en moléculas naturales y sintéticas con actividad biológica de interés. En la naturaleza se encuentra presente, por ejemplo, en el triptófano (un aminoácido esencial) y en las proteínas que lo contienen, en alcaloides como la triptamina, en hormonas como la melatonina y en neurotransmisores como la serotonina⁵ (Figura 3). Diversos pigmentos naturales como el índigo y la púrpura de Tiro también poseen indol en sus estructuras. Además, el indol está presente en numerosos fármacos tales como reserpina (anti-hipertensivo), vinblastina (anticanceroso), indometacina (antiinflamatorio no esteroideo) o pindolol (beta bloqueante) (Figura 3). Esto hace del indol una “estructura privilegiada”, término acuñado por Evans y colaboradores para designar moléculas capaces de actuar como ligandos frente a una amplia variedad de receptores,^{6,7,8} en la que han centrado su interés muchos proyectos de investigación básica y aplicada desde hace más de 100 años.

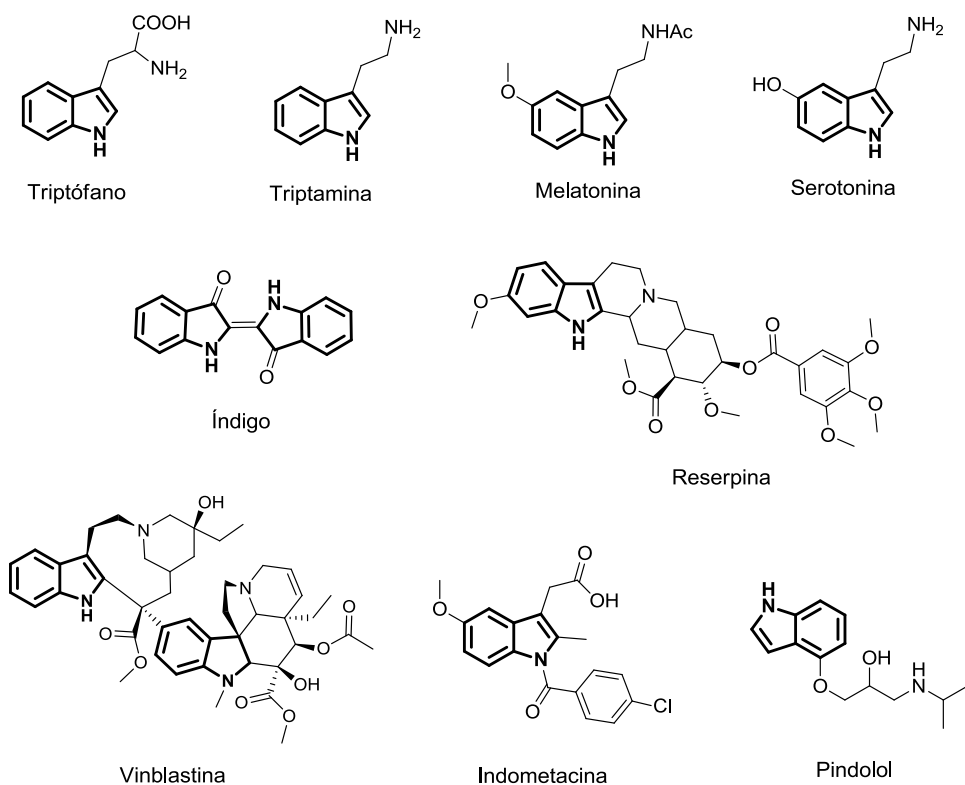


Figura 3. Compuestos naturales y fármacos con anillos de indol en sus estructuras

Desde un punto de vista estructural, el indol está formado por un anillo de benceno y otro de pirrol fusionados. El indol es por tanto una molécula rica en electrones que experimenta fundamentalmente reacciones de sustitución electrófila aromática (S_EAr) en las posiciones 2 y 3, siendo la sustitución electrófila en posición 3 (“enamine site”) la preferida por su gran densidad electrónica y estabilidad de sus formas resonantes (Figura 4).

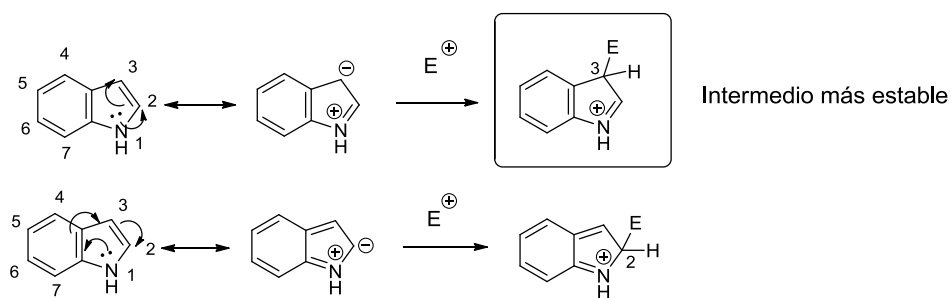


Figura 4. S_EAr en el anillo de indol

Por otra parte, el hidrógeno del NH del indol puede ser abstraído mediante el uso de bases fuertes formando el anión indolilo que posee dos formas resonantes con carga negativa en N1 y C3. El carácter nucleófilo de estas dos posiciones depende de la naturaleza del ion metálico y del disolvente utilizado. En presencia de bases como Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , NaH o BuLi, la

posición N1 suele ser la más reactiva, sin embargo con el uso de magnesianos como base (RMgX) se favorece la reactividad de la posición C3 frente a N1 (Figura 5).

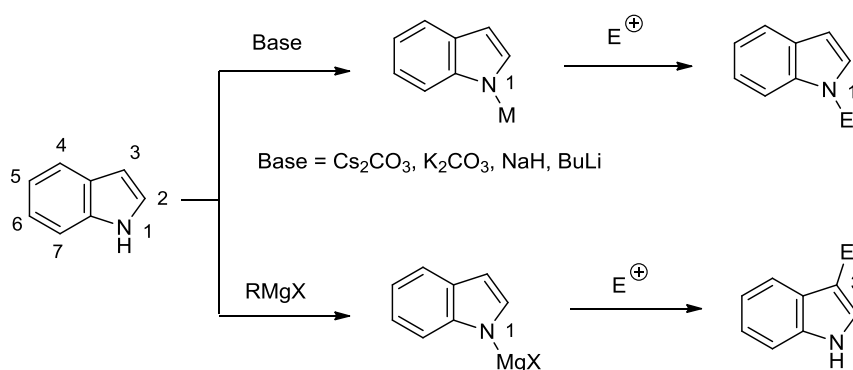


Figura 5. $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ en condiciones básicas

Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación de indoles y triptófanos

Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio descubiertas por los investigadores Richard Heck (EEUU), Ri-ichi Negishi (EEUU) y Akira Suzuki (Japón), galardonados en 2010 con el premio Nobel en Química, es un tipo específico de reacción para la formación de enlaces C-C entre dos carbonos sp^2 . Este tipo de reacción constituye una importante herramienta sintética que ha sido aplicada con éxito para la síntesis de moléculas complejas, productos naturales, medicamentos y/o compuestos biológicamente activos. Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio también son aplicables a gran escala, por lo que se han empleado con éxito en un gran número de transformaciones industriales. De ahí que desde su descubrimiento en la última década de los años 70 este tipo de reacción haya supuesto una verdadera revolución en la metodología sintética aplicándose en campos tan diversos como la agricultura, los materiales de alta tecnología y en investigación académica.

En el caso de moléculas aromáticas, en un primer paso de reacción cada una de las moléculas se une al catalizador de paladio a través de la formación de enlaces carbono-metal. En un segundo paso, los átomos de carbono de los anillos aromáticos se unen entre sí y permiten la formación de un nuevo enlace simple $\text{Ar-Ar}'$, difícil de conseguir por otros métodos (Figura 6). Esta metodología supone una alternativa atractiva a los métodos de acoplamiento cruzado más clásicos que implican la diferente pre-funcionalización (halogenación, metalación) de las dos moléculas aromáticas implicadas en la reacción, lo que requiere múltiples pasos sintéticos.

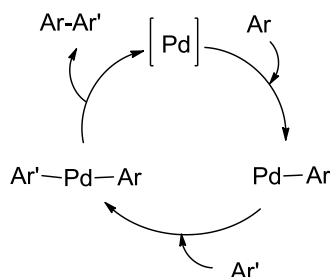


Figura 6. Ciclo catalítico de Pd para la formación de enlace Ar-Ar'

Como hemos comentado anteriormente, prácticamente todos los sectores de la química orgánica se han visto beneficiados por las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio y el indol no iba a ser una excepción. De este modo, en los últimos años se han descrito una gran variedad de estudios metodológicos sobre la catálisis de paladio aplicada a la síntesis y funcionalización de indoles. Sin embargo, el empleo de esta metodología en moléculas biológicas como el triptófano y más aún en los péptidos y proteínas en las que el indol está presente, plantea muchos problemas de estabilidad, enantioselectividad, etc... que en muchos casos no son fáciles de resolver. Por ello, la metodología empleada para la funcionalización del triptófano y las proteínas que contienen dicho aminoácido requiere condiciones particulares distintas a las empleadas para el indol, siendo aún muy pocos los métodos descritos para ello.

Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación directa de indoles y triptófanos en posición C2

Los primeros métodos descritos para la arilación directa de la posición C2 del indol se basan en el empleo de catalizadores de Pd^0 tales como $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ o $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$. Dicha metodología, tal y como se ha comentado, supone una clara ventaja frente a las condiciones de acoplamiento clásicas que implican la diferente pre-funcionalización de las dos moléculas aromáticas implicadas en el acoplamiento, lo que requiere múltiples pasos sintéticos. Desafortunadamente, la arilación directa empleando condiciones de Pd^0 presenta también una serie de desventajas tales como el empleo de altas temperaturas (125-150 °C), prolongados tiempos de reacción (24-48 h) y alta sensibilidad al aire y a la humedad. Todo ello hace que la aplicabilidad de este tipo de reacción y su compatibilidad con determinados grupos funcionales sea limitada. Estos inconvenientes se deben a la particular estructura del indol, en el que la sustitución electrófila en posición 3 es la preferida por su gran densidad electrónica, así como al mecanismo de la reacción en el que están implicadas especies de $\text{Pd}^{0/\text{II}}$.

Como alternativa, Sanford y colaboradores⁹ desarrollan un nuevo procedimiento para la arilación de indoles en posición C2 empleando condiciones mucho más suaves (25–80 °C). Dicho método se basa en el uso de catalizadores de Pd^{II} , tales como $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ o $\text{IMesPd}(\text{OAc})_2$, más electrófilos que los de Pd^0 comentados con anterioridad. El mecanismo de

la reacción transcurre a través de un ciclo de $\text{Pd}^{\text{II/IV}}$, más eficiente que el ciclo de $\text{Pd}^{0/\text{II}}$. Para la arilación se emplea un reactivo de iodo hipervalente (I^{III}) $[(\text{Ar-I-Ar})\text{BF}_4]$ que es a la vez un electrófilo fuerte y un poderoso oxidante (Figura 7). Precisamente uno de los inconvenientes de este método reside en la limitada accesibilidad sintética de dicho reactivo.

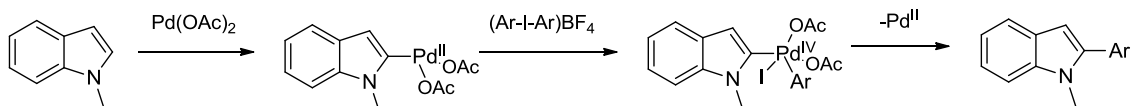


Figura 7. Método de Sanford para la arilación en posición C2 del anillo de indol

Más tarde, Larrosa y colaboradores¹⁰ desarrollan una nueva metodología para la arilación directa en posición C2 de indoles *N*-sustituídos. En la reacción se emplea $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Ag_2O y ácido 2-nitrobenzoico ($2\text{-NO}_2\text{PhCOOH}$) en DMF (Figura 8). Una clara ventaja con respecto al método de Sandford consiste en el uso de ioduros de arilo comerciales. La reacción es compatible con una gran variedad de grupos funcionales, tanto atractores como donadores de electrones, presentes tanto en el ioduro de arilo como en el anillo de indol. La presencia de la sal de plata (Ag_2O), empleada para aumentar la electrofilia de los complejos de Pd, así como el ácido 2-nitrobenzoico, resulta crucial para la reacción. El método funciona mejor con anillos de indol *N*-metilados (NMe) que libres (NH) ya que en este último caso se forman especies de *N*-arilación.

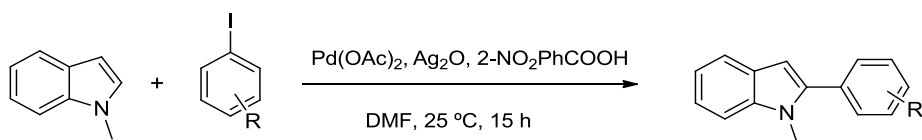


Figura 8. Método de Larrosa para la arilación en posición C2 del anillo de indol

Posteriormente, el grupo de Lavilla/Albericio^{1,2} extiende el método de Larrosa a moléculas biológicas con propiedades sintéticas particulares, triptófano y péptidos en los que el triptófano está presente, llegando a una serie de mejoras de interés. Entre ellas la posibilidad de usar el triptófano con el NH del indol desprotegido y el empleo de ácido trifluoroacético (TFA) para evitar la arilación de dicho NH (Figura 9). Una clara ventaja del TFA frente al ácido 2-nitrobenzoico empleado por Larrosa, que tenía que ser eliminado por cromatografía, es su bajo punto de ebullición lo que implica que puede ser eliminado mediante evaporación a vacío. Por otra parte, en esta metodología se introduce el empleo de microondas que resulta crucial para acortar los tiempos de reacción y evitar así la epimerización del aminoácido.

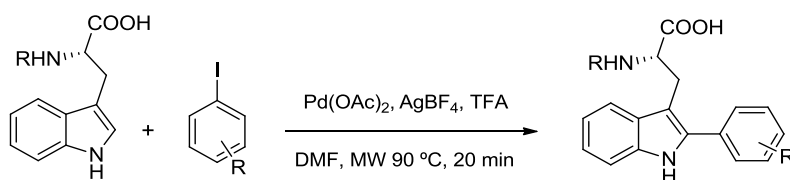


Figura 9. Método de Lavilla/Albericio para la arilación en posición C2 del anillo de indol

En resumen, esta última metodología ofrece una serie de ventajas que la hacen sumamente atractiva para llevar a cabo la arilación en posición C2 de los compuestos **I** y **II**. Entre ellas podemos destacar la posibilidad de usar triptófano con su NH libre, yoduros de arilo comerciales, quimioselectividad (arilación preferente en posición C2 frente a C3 o N1) y tiempos cortos de reacción gracias al uso de microondas.

El mecanismo propuesto por Lavilla/Albericio para este tipo de reacción sería el que se muestra en la Figura 10. En primer lugar, la coordinación del derivado de Trp **1** con las especies de Pd^{II} , muy electrófilas, podría transcurrir a través de un mecanismo de metalación-desprotonación para generar el complejo de Pd^{II} **2**. La inserción del enlace C-I del yoduro de arilo (Ar-I) en dicho intermedio mediante adición oxidativa, podría dar lugar al complejo de Pd^{IV} **3** y un catión de Ag^{I} , que atraparía el yoduro, dando lugar a una eliminación reductiva que conduciría al compuesto final arilado **4**, regenerando el Pd^{II} que estaría de nuevo disponible para actuar como catalizador. El TFA presente en el medio de reacción tendría la acidez suficiente ($\text{pK}_a = 0.23$) como para protonar el NH del Trp evitando su improductiva coordinación con el metal. La DMF es un disolvente muy adecuado para el proceso ya que facilitaría la disolución de los reactivos y contribuiría a estabilizar los intermedios de paladio.

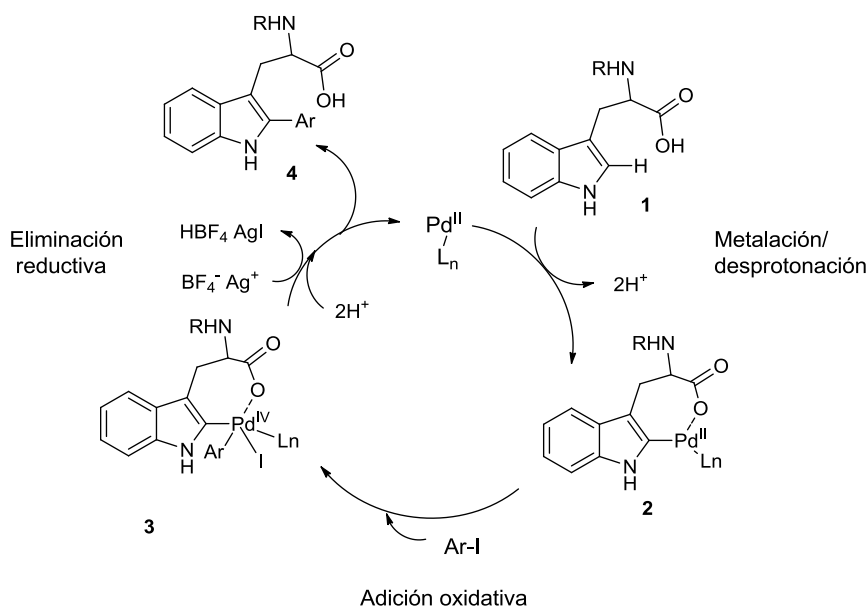


Figura 10. Ciclo catalítico de $\text{Pd}^{\text{II/IV}}$ propuesto por Lavilla/Albericio para la arilación del Trp en posición C2

Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio para la arilación de indoles y triptófanos en posición C7

Como se ha comentado al inicio de este capítulo, las posiciones N1, C2 y C3 del anillo de indol son las más reactivas, y por tanto las más fáciles de funcionalizar debido a la deslocalización de densidad electrónica que existe entre ellas. Sin embargo, la funcionalización, y en particular la arilación de las posiciones C4, C5, C6 y C7, es mucho más complicada y por ello la metodología sintética descrita para ello es mucho más escasa. Entre los métodos descritos en la literatura para la formación de enlaces C-C en dichas posiciones, destaca el acoplamiento de Suzuki o Suzuki-Miyaura descubierto por estos investigadores en 1981.¹¹ Este método implica un primer paso de reacción en el que se forman aril boranos que, seguidamente, se hacen reaccionar, en presencia de un catalizador de paladio y medio básico,¹² con un segundo anillo aromático para dar diarilos con excelentes rendimientos y alta regio- y estereoselectividad. (Figura 11). Los reactivos empleados son de fácil accesibilidad sintética o incluso comerciales, estables en medio acuoso y no son tóxicos.

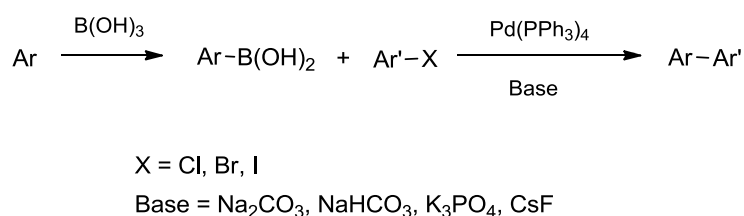


Figura 11. Reacción de Suzuki-Miyaura para la formación de enlaces Ar-Ar

El mecanismo propuesto para este tipo de reacción implica la formación de un ciclo catalizado por paladio, similar al descrito con anterioridad (Figura 10), con la particularidad de la participación de aril boranos como una de las especies reactivas y el empleo de condiciones de reacción básicas.¹³

Desde su descubrimiento y hasta la actualidad, se han llevado a cabo diversas mejoras en este tipo de reacción. Entre ellas el uso de ésteres borónicos, más estables que los ácidos borónicos, así como distintos catalizadores de Pd¹⁴ o incluso Niquel,¹⁵ empleado con cloruros de arilo ya que son menos reactivos que los bromuros o yoduros.

La formación de los aril boranos requeridos en la reacción, se ha llevado a cabo siguiendo diversos métodos.¹⁶⁻²⁰ Entre ellos, Movassaghi²¹ describe en 2014 un método muy eficaz para la introducción de boro en indoles 3-sustituidos, que extendió más tarde a triptófanos y triptaminas (Figura 12). Esta metodología consta de dos etapas sintéticas. En la primera se realiza la introducción de boro en las posiciones C2 y C7 del anillo de indol y en la segunda tiene lugar la eliminación de boro en la posición C2, quedando solo la posición C7 sustituida con boro. En la primera etapa se utiliza pinacolborano (HBpin), [Ir(OMe)(cod)]₂ y 4,4'-

di-*tert*-butil-2,2'-bipiridina (dtbpy). La segunda etapa en la que se elimina boro en posición C2 se lleva a cabo en medio ácido (ácido acético) en presencia de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como catalizador (segunda etapa, ruta a, Figura 12). Debido a la incompatibilidad de algunos grupos funcionales con el medio ácido utilizado en esta metodología, dos años después, Smith y Maleczka²² modificaron las condiciones de reacción empleando una sal de bismuto (III) ($\text{Bi}(\text{OAc})_3$) en lugar del medio ácido empleado por Movassaghi (segunda etapa, ruta b, Figura 12).

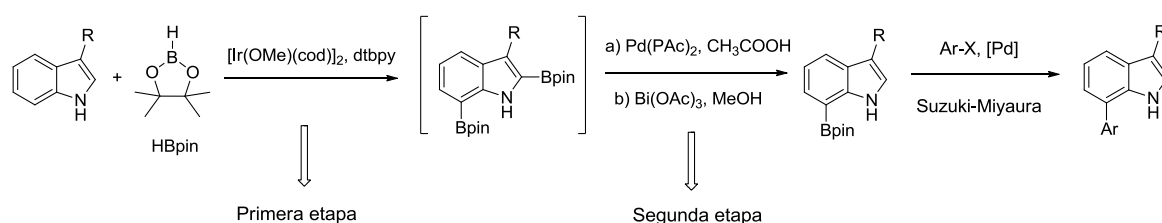


Figura 12. Boración en posición C7 del anillo de indol

Una vez obtenido el aril borano, se hace reaccionar con un haluro de arilo (Ar-X) en presencia de un catalizador de paladio y condiciones básicas, para dar el indol arilado en C7 deseado (Esquema 12). Como veremos más adelante, esta metodología fue la empleada para llevar a cabo la arilación en posición C7 de los anillos de indol presentes en los compuestos **I** y **II**.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

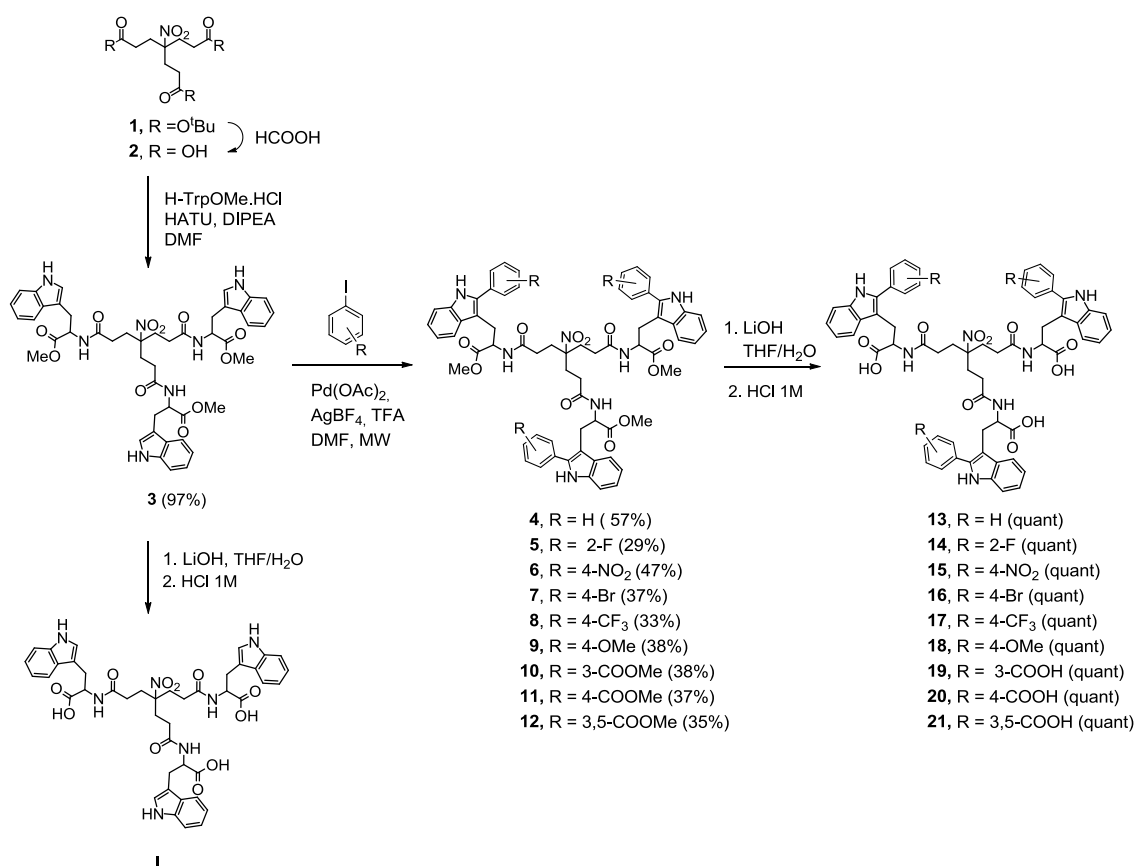
Síntesis de los compuestos arilados en la posición C2 del anillo de indol

El paso clave para la síntesis de los derivados de Trp C2 arilados, es el acoplamiento cruzado catalizado por paladio, siguiendo las condiciones descritas por Lavilla/Albericio^{1,2} comentadas con anterioridad. Es importante destacar que fue necesario adaptar las condiciones de reacción ya que nuestras moléculas presentaban tres o cuatro triptófanos en su estructura, mientras que el método había sido descrito para un único Trp.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los trímeros **13–21** a partir del compuesto **3** como se indica en el Esquema 1. Para ello, seleccionamos como compuesto de partida el nitrotriéster comercial **1**, con sus ácidos protegidos como ésteres *tert*-butílicos. La desprotección en medio ácido (ácido fórmico) de **1**, condujo al triácido **2**²³ con rendimiento cuantitativo. A continuación, el triácido **2** se hizo reaccionar con $\text{H-TrpOMe}\cdot\text{HCl}$ en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base, conduciendo al compuesto deseado **3** con un 97% de rendimiento.

Para la arilación en posición C2 de los 3 Trps presentes en **3**, se emplearon las condiciones descritas por Lavilla/Albericio.^{1,2} Primeramente, se llevó a cabo la reacción en microondas a 80°C del compuesto **3** con yoduro de fenilo (3 eq), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (5% molar), AgBF_4

(3 eq) y TFA (3 eq) en DMF. Al cabo de 15 minutos se observó, mediante HPLC, que tan solo un 10% del compuesto deseado **4** se había formado en la reacción. Los picos con movilidad cromatográfica similar a **4**, fueron atribuidos a la arilación parcial en posición C2 de tan solo 1 o 2 Trps de los presentes en el compuesto **4**. Para mejorar el rendimiento del compuesto arilado en los 3 Trps, se aumentó el tiempo de reacción (30 minutos) y la temperatura (120 °C), así como los equivalentes de yoduro de fenilo (6 eq) y de AgBF_4 (6 eq). De esta manera se obtuvo el compuesto **4** con un 57% de rendimiento (Esquema 1). Finalmente, la desprotección en medio básico ($\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$) de los ésteres metílicos presentes en **4**, seguido de acidificación con HCl acuoso, condujo al compuesto **13** con rendimiento cuantitativo.



Esquema 1. Síntesis de **1** y los trímeros C2 arilados **13-21**

La caracterización, tanto por resonancia magnética nuclear (RMN) como por masas exactas del compuesto **4**, confirmó la formación de nuevos enlaces C-C en la posición C2 del anillo de indol (uno por cada triptófano). Así y tal como se observa en la Figura 13, en el espectro de protón en CDCl_3 del compuesto de partida **3**, aparece un doblete a un desplazamiento de $\delta = 6,87$ ppm, correspondiente al hidrógeno aromático en posición C2, que desaparece en el compuesto arilado **4**, confirmando la entrada del anillo de fenilo en la posición C2 del anillo de indol.

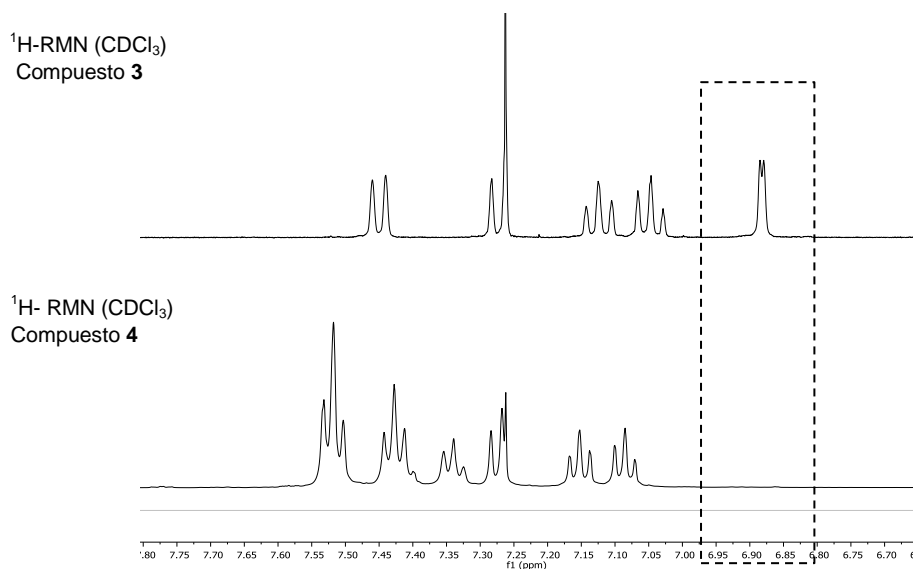


Figura 13. ^1H -RMN de los compuestos **3** y **4** en CDCl_3

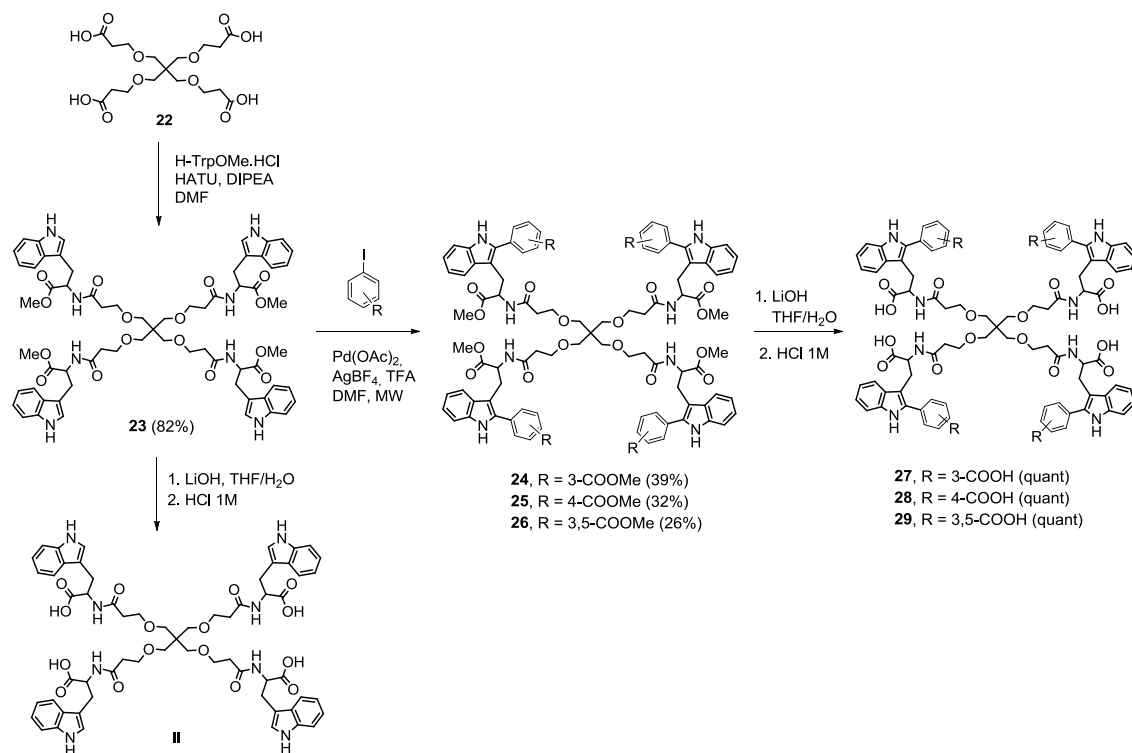
En base a los buenos resultados obtenidos con el yoduro de fenilo, decidimos extender esta metodología empleando distintos yoduros de arilo comerciales, con anillos aromáticos portadores de grupos funcionales de diferente naturaleza y obtener así una serie de compuestos modificados en posición C2 del anillo de indol con los que llevar a cabo estudios de relaciones estructura-actividad.

De este modo, siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AgBF_4 y TFA en DMF), llevamos a cabo la reacción de **3** con una serie de yoduros de arilo portadores de diversos grupos funcionales (F, NO_2 , Br, CF_3 , OMe y COOMe), obteniendo los compuestos C2 arilados **5** (29%), **6** (47%), **7** (37%), **8** (33%), **9** (38%), **10** (38%), **11** (37%) y **12** (35%) (Esquema 1). La posterior reacción de saponificación de los ésteres metílicos en medio básico ($\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$) presentes en los derivados **5–12**, seguido de acidificación (HCl 1M), condujo a los compuestos totalmente desprotegidos **14–21** con rendimientos cuantitativos. De igual manera la saponificación de **3** condujo al trímero **I** con rendimiento cuantitativo.

A continuación se llevó a cabo la síntesis de los tetrámeros **27–29** (Esquema 2). En este caso se empleó como compuesto de partida el tetraácido **22**, sintetizado mediante metodologías descritas en la literatura.^{24,25} La reacción de **22** con H-TrpOMe-HCl en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base, condujo al compuesto **23** con un 82% de rendimiento.

Siguiendo las condiciones anteriormente descritas para los trímeros ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, AgBF_4 y TFA en DMF), se hizo reaccionar el compuesto **23** con los correspondientes yoduros de arilo obteniéndose los compuestos **24** (39%), **25** (32%) y **26** (26%) con rendimientos moderados (Esquema 2). La posterior saponificación en medio básico ($\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$) seguido de acidificación (HCl 1M), permitió la obtención de los compuestos finales **27–29** con sus grupos ácidos libres,

con rendimientos cuantitativos. De igual manera, la saponificación de **23** condujo al compuesto **II**.

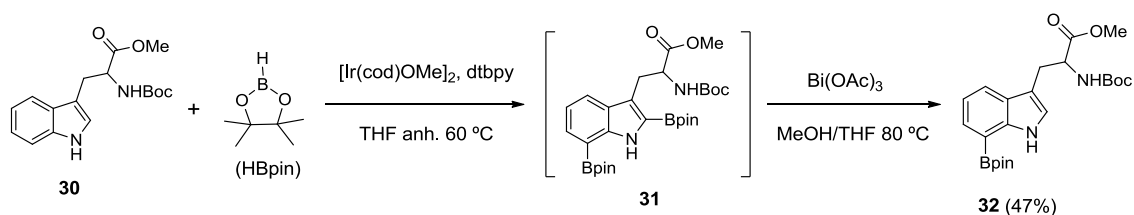


Esquema 2. Síntesis de **II** y los tetrámeros C2 arilados **27-29**

Síntesis de los compuestos arilados en la posición C7 del anillo de indol

La síntesis de los derivados de Trp con modificaciones en la posición C7 del anillo de indol, se llevó a cabo en base a la reacción de boración descrita por Movassaghi-Smith-Maleczka^{21,22} y posterior acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, comentadas al inicio de este capítulo.

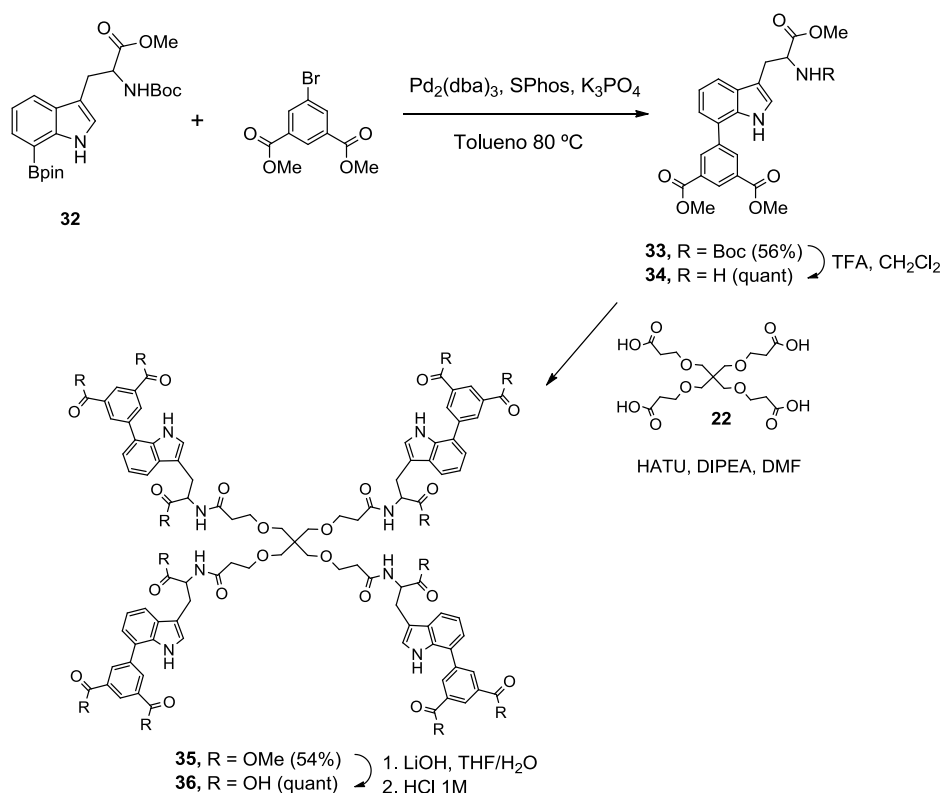
En primer lugar, se abordó la síntesis del triptófano **32** borado en posición C7 (Esquema 3). Para ello se empleó como compuesto de partida el triptófano comercial **30** con su grupo ácido protegido como éster metílico y su grupo amino *tert*-butilado. El compuesto **30** se hizo reaccionar con pinacolborano comercial (HBpin) en presencia del catalizador de iridio [Ir(cod)OMe]₂ y 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridina (dtbpy), lo que condujo al intermedio **31** sustituido con boro en C2 y C7, que sin necesidad de purificación se hizo reaccionar con Bi(OAc)₃ en una mezcla metanol/THF para dar el triptófano **32** borado tan solo en posición C7 con un 47% de rendimiento.



Esquema 3. Síntesis del triptófano **32** borado en posición C7

Hay que destacar que el uso de la sal de bismuto ($\text{Bi}(\text{OAc})_3$) en el segundo paso de reacción, introducida por Smith y Maleczka, fue clave para la obtención del compuesto **32**, ya que las condiciones ácidas (AcOH) propuestas anteriormente por Movassaghi, conducían a mezclas de compuestos y a la desprotección no deseada del grupo amino presente en **32**.

Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio del compuesto borado **32** con dimetil 5-bromoisoftalato en presencia de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, SPhos y K_3PO_4 .²¹ De esta forma se obtuvo el triptófano C7 arilado **33** con un 56% de rendimiento (Esquema 4). La posterior desprotección en medio ácido (TFA) del grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) presente en **33**, condujo al compuesto **34**, que posteriormente reaccionó, a través de su grupo amino libre, con el tetraácido **22** en presencia de HATU como agente de acoplamiento y DIPEA como base, para dar el tetrámero **35** con un 54% de rendimiento. La posterior reacción de saponificación en medio básico ($\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$), seguido de acidificación (HCl 1M), condujo al compuesto totalmente desprotegido **36** con rendimiento cuantitativo.

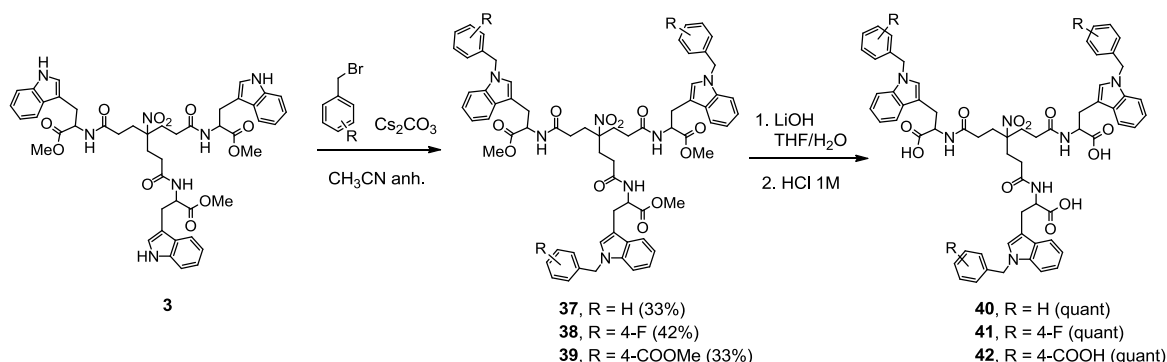


Esquema 4. Síntesis del tetrámero C7 arilado **36**

Síntesis de los compuestos arilados en la posición N1 del anillo de indol

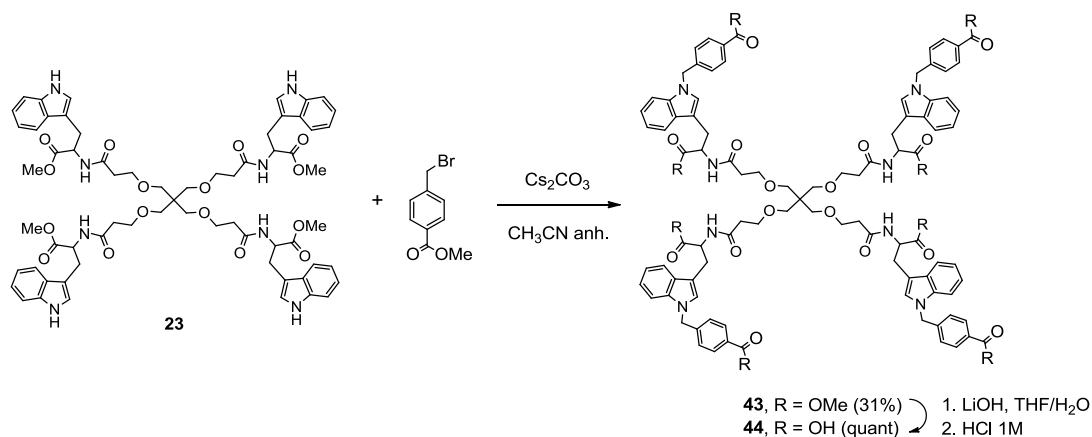
Finalmente, para completar los estudios de relaciones estructura-actividad decidimos introducir en la posición N1 del indol anillos aromáticos con grupos funcionales de distinta naturaleza. Al igual que ocurrió con las arilaciones en la posición C2, comentadas en los apartados anteriores, en este caso también fue necesario adaptar las condiciones de reacción descritas en la literatura para 1 triptófano, ya que nuestros compuestos poseen 3 y 4 Trps.

En primer lugar, se hizo reaccionar el compuesto **3** con bromuro de bencilo en medio básico (NaH) a 80 °C, empleando acetonitrilo anhidro como disolvente. Dicha reacción condujo a mezclas de compuestos de difícil purificación. El empleo de otras bases (K_2CO_3 o DBU), así como otros disolventes (DMF), condujo incluso a peores resultados. Finalmente cuando se empleó Cs_2CO_3 como base, acetonitrilo anhidro como disolvente y 80 °C de temperatura, se obtuvo el compuesto **37** con un 33% de rendimiento. Siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas, llevamos a cabo la reacción de **3** con otros bromuros de bencilo portadores de diversos grupos funcionales (F, COOMe), obteniéndose los compuestos **38** y **39** con un 42% y 33% de rendimiento respectivamente. La posterior saponificación en medio básico (LiOH/ H_2O) de los ésteres metílicos presentes en **37–39**, seguido de acidificación (HCl 1M), permitió la obtención de los compuestos **40–42** con rendimientos cuantitativos (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis de los trímeros N1 arilados **40–42**

De igual manera, llevamos a cabo la reacción de **23** con metil 4-(bromometil)benzoato obteniendo el compuesto **43** (31%), cuya desprotección en medio básico (LiOH/ H_2O) y posterior acidificación, condujo al compuesto **44** con rendimiento cuantitativo (Esquema 6).

Esquema 6. Síntesis del tetrámero N1 arilado **44**

Resultados biológicos

Los compuestos preparados dentro del presente capítulo se evaluaron, en primer lugar, frente a la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) en cultivo celular empleando la línea celular MT-4. Además, los compuestos fueron evaluados frente a la replicación de enterovirus 71 (EV71) en cepas de laboratorio (BrCr) empleando células de rhabdomyosarcoma (RD) susceptibles de ser infectadas por EV71. Los procedimientos empleados para la evaluación biológica fueron análogos a los descritos en los capítulos anteriores.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 para los compuestos sustituidos en posición C2 (**13–21** y **27–29**), C7 (**36**) y N1 (**40–42** y **44**) del anillo de indol, junto a los compuestos sin sustituir **I** y **II**. Además, en esta tabla se ha incluido, a efectos comparativos, los datos de actividad del prototipo **AL-385**, con 12 Trps en la periferia, y de algunos compuestos patrones que inhiben fases tempranas del ciclo replicativo del virus, tales como dextran sulfato (DS-5000, un inhibidor de adsorción)²⁶ y pradimicina A (PRM-A, un inhibidor de entrada con carga negativa que se une a los carbohidratos de la glicoproteína gp120).²⁷

Como se muestra en la Tabla 1, los compuestos **I** y **II** fueron inactivos frente a la replicación del VIH. También resultaron inactivos los compuestos **16** y **18** con los grupos 4-bromofenil y 4-metoxifenil en posición C2 del anillo de indol. Sin embargo, los compuestos C2 arilados **13** (fenil), **14** (4-fluorofenil), **15** (4-nitrofenil) y **17** (4-trifluorometilfenil) mostraron actividad anti-VIH moderada pero significativa. Estos datos contrastan con la inactividad

mostrada por los compuestos **I** y **II**, lo que indica que los sustituyentes en posición C2 parecen importantes para la actividad anti-VIH.

Tabla 1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células MT-4

Compuesto	VIH-1 CE ₅₀ ^a (μM)	VIH-2 CE ₅₀ ^a (μM)	CC ₅₀ ^b (μM)	IS ^c	PM ^d (Da)
13	19	>83	83	4.4	1064.15
14	35 ± 10	>100	>100	>2.9	1118.12
15	41 ± 3.8	43 ± 11	>100	>2.4	1199.14
16	>30	>30	30 ± 4.3	ND	1300.83
17	26 ± 10	68 ± 6.0	>100	>3.8	1268.14
18	>9.3	>9.3	9.3 ± 0.29	ND	1154.22
19	13.4	53.5	>100	>7.5	1196.17
20	2.4	>71	71	29.6	1196.17
21	0.27 ± 0.12	0.63 ± 0.83	>100	>370.4	1328.20
27	1.2	0.46	>100	>82.6	1649.66
28	0.73 ± 0.51	0.10	>100	>137	1649.66
29	0.07 ± 0.04	0.11 ± 0.09	>100	>1428.6	1825.70
36	0.02	0.02	>100	>5000	1825.70
40	51	44	>100	>2	1106.25
41	46	41	>100	>2.2	1160.22
42	46	58	>100	>2.2	1238.27
44	>53	>53	53	ND	1705.76
I	>100	>100	>100	ND	835.86
II	>50	>50	>250	ND	1169.24
AL-385	2.3 ± 0.30	6.6 ± 7.7	>100	>43.5	3575.84
DS-5000	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	>20	>285.7	~5000
PRM-A	3.3 ± 1.2	5.9 ± 3.7	>100	>30.3	842.80

ND: no determinado

^aCE₅₀: concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células MT-4 del efecto citopático de virus

^bCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas

^cIS: índice de selectividad (CC₅₀/CE₅₀)

^dPM: peso molecular de los compuestos expresado en Daltons (Da)

Entre los trímeros **19–21** y tetrámeros **27–29**, sustituidos en posición C2 con anillos aromáticos portadores de ácidos libres (COOH), se encuentran los compuestos más activos de la serie. Podemos observar un aumento de actividad en relación al número de grupos ácidos

presentes en el anillo aromático, siendo el trímero **21** ($CE_{50} = 0.27 \mu M$) y el tetrámero **29** ($CE_{50} = 0.07 \mu M$), con anillos de fenilo portadores de 2 COOHs en las posiciones 3 y 5, los que mejor actividad anti-VIH mostraron. Ambos compuestos son, respectivamente, 10 y 30 veces más activos que el prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 2.3 \mu M$), mientras que su peso molecular es significativamente menor (**21** = 1328.20 Da, **29** = 1825.70 Da y **AL-385** = 3575.84 Da).

Por otra parte, el trímero **20** ($CE_{50} = 2.4 \mu M$) y el tetrámero **28** ($CE_{50} = 0.73 \mu M$), con grupos COOHs en posición *para* del anillo aromático, presentan mejor actividad que sus homólogos **19** ($CE_{50} = 13.4 \mu M$) y **27** ($CE_{50} = 1.2 \mu M$) con los COOHs en posición *meta*. Estos resultados indican que tanto el número como la posición de los COOHs en el anillo aromático es importante para la actividad anti-VIH.

El tetrámero **36** ($CE_{50} = 0.02 \mu M$), modificado en C7 con un anillo de fenilo sustituido con 2 COOHs en las posiciones 3 y 5, muestra actividad submicromolar 3 veces superior a la de su homólogo **29** ($CE_{50} = 0.07 \mu M$), arilado en posición C2 del anillo de indol. Además, **36** resultó 115 veces más activo que el prototipo **AL-385**. Este resultado apoya el interés de la posición C7 del anillo de indol para la obtención de compuestos más activos y de menor peso molecular que el prototipo.

El desplazamiento del anillo aromático a la posición N1 del indol conduce a una notable pérdida de actividad. Este efecto es especialmente acusado en los tetrámeros **28** y **44**, portadores de anillos aromáticos con 1 COOH en posición *para*. Así, mientras que **28**, arilado en posición C2 es 10 veces más activo que el prototipo, el compuesto **44**, arilado en N1, es inactivo.

Por todo ello, podemos concluir que mediante la introducción de anillos aromáticos sustituidos con grupos COOHs en las posiciones C2 o C7 de los anillos de indol presentes en **I** y **II**, se ha conseguido recuperar la actividad anti-VIH perdida al eliminar un número significativo de Trps (9 y 8) con respecto al prototipo. Además, los compuestos sintetizados en este capítulo poseen menor peso molecular (~1500 Da) que el prototipo **AL-385** (3575.84 Da) lo que podría contribuir a mejorar sus propiedades farmacocinéticas.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de EV71

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2, donde se han incluido como referencia los compuestos **I** y **II**, el prototipo **AL-385** y el pirodovir, un inhibidor de entrada capaz de unirse a la cápsida viral.²⁸

En general, los datos de actividad observados frente a EV71 fueron similares a los de VIH. De este modo, el trímero **I** y el tetrámero **II**, sin sustituciones en el anillo de indol, fueron inactivos frente a la replicación de EV71. También lo fueron, el fenil derivado **13**, y los compuestos **14**, **17** y **18** sustituidos en posición C2 del anillo de indol con anillos aromáticos

portadores de diferentes grupos funcionales (F, Br, OMe). Sin embargo, al igual que se observó para VIH, los trímeros **19** y **21** y los tetrámeros **27–29** con anillos de fenilo portadores de grupos COOHs en diferentes posiciones (*meta* y *para*), mostraron actividad anti-EV71 submicromolar.

Tabla 2. Datos de actividad frente a EV71 en células RD

Compuesto	EV71 CE ₅₀ ^a (μM)	EV71 CE ₉₀ ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)	IS ^d	PM ^e (Da)
13	>100	ND	ND	ND	1064.15
14	>89.4	ND	ND	ND	1118.12
15	28.8 ± 4.9	58.2 ± 16.3	>83.4	ND	1199.14
16	65.2	ND	ND	ND	1300.83
17	>78.9	ND	ND	ND	1268.14
18	>86.6	ND	ND	ND	1154.22
19	0.99 ± 0.01	1.35 ± 0.11	>83.6	>73.4	1196.17
20	12.2 ± 0.33	ND	>33	ND	1196.17
21	0.35 ± 0.03	0.55 ± 0.02	>75.3	>203	1328.20
27	0.19 ± 0.01	0.30 ± 0.01	>60.6	>336	1649.66
28	0.37 ± 0.08	0.63 ± 0.14	56.4	161	1649.66
29	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.01	11	110	1825.70
36	0.32 ± 0.03	0.56 ± 0.04	>54.8	>171	1825.70
44	>19.5	ND	ND	ND	1705.76
I	>120	ND	>120	ND	835.86
II	>100	ND	ND	ND	1169.24
AL-385	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	24.9	83	3575.84
Pirodavisir	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	>100	>333.3	369.47

ND = No determinado.

^aCE₅₀: concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

^bCE₉₀: concentración efectiva 90, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 90% de las células del efecto citopático de virus.

^cCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

^dIS: índice de selectividad (CC₅₀/CE₅₀)

^ePM: peso molecular de los compuestos expresado en Daltons (Da)

En contraste con lo observado para VIH, en este caso el trímero **19** (CE₅₀ = 0.99 μM) y el tetrámero **27** (CE₅₀ = 0.19 μM), sustituidos en posición C2 con anillos aromáticos portadores de grupos COOHs en posición *meta*, presentan mejor actividad que sus homólogos **20** (CE₅₀ = 12.2 μM) y **28** (CE₅₀ = 0.37 μM) con los grupos COOHs en posición *para*.

El trímero **21** ($CE_{50} = 0.35 \mu M$) y los tetrámeros **27** ($CE_{50} = 0.19 \mu M$), **28** ($CE_{50} = 0.37 \mu M$) y **36** ($CE_{50} = 0.32 \mu M$) son tan activos como el prototipo **AL-385** ($CE_{50} = 0.3 \mu M$), aunque resultaron menos tóxicos que éste, por lo que su índice de selectividad es superior.

Con respecto a las posiciones C2 y C7 (compuestos **29** y **36**) no se observaron diferencias muy acusadas en cuanto a la actividad ($CE_{50} = 0.10 \mu M$ frente a $0.32 \mu M$) pero si en la toxicidad ($CC_{50} = 11 \mu M$ frente a $>54.8 \mu M$), por lo que el índice de selectividad de **36** (IS >171) es superior al de **29** (IS = 110).

El tetrámero **44**, sustituido en posición N1 con grupos bencilo portadores de COOHs en posición *para*, resultó inactivo frente a EV71 al igual que se obtuvo para VIH. Sin embargo, su homólogo **28** ($CE_{50} = 0.37 \mu M$), con idéntica sustitución en posición C2, resultó tan activo como el prototipo. Este resultado indica que el NH del anillo de indol es importante para la actividad ya que podría estar involucrado en la formación de un enlace de hidrógeno con el sitio de unión.

En conclusión, al igual que se había observado para VIH, parece que la presencia de anillos aromáticos portadores de grupos COOH en las posiciones C2 y C7 del anillo de indol es beneficiosa para la actividad antiviral y compensa la pérdida de un número significativo de Trps con respecto al prototipo **AL-385**.

Dentro de esta serie los compuestos, **27** y **29** son los que mejor actividad presentan, sin embargo la mayor toxicidad de **29** ($CC_{50} = 11 \mu M$) frente a **27** ($CC_{50} >60.6 \mu M$) lo descarta como compuesto de referencia para continuar con los estudios biológicos. El compuesto **27** presenta un peso molecular (1649.66 Da) significativamente menor que el prototipo **AL-385** (3575.84 Da) lo que probablemente contribuya a mejorar sus propiedades farmacocinéticas

La actividad y toxicidad del trímero **21** resultó muy similar a la observada para el tetrámero **27**, sin embargo, la síntesis de **21** fue más sencilla y su peso molecular algo menor. Por ello, consideramos el trímero **21** como prototipo de esta serie para llevar a cabo los estudios biológicos que se describen en el capítulo 4 de esta memoria.

CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo que se describe en el presente capítulo era la obtención de moléculas más pequeñas que el prototipo **AL-385** en las que se mantuviese la actividad antiviral frente a VIH y EV71. Para ello se sintetizaron el trímero **I** y el tetrámero **II** en los que se eliminaron los espaciadores presentes en el prototipo y los triptófanos se unieron directamente al esqueleto central. Sin embargo, dichos compuestos resultaron inactivos frente a la replicación de ambos virus.

Con la hipótesis de que establecer interacciones “extras” con el sitio de unión podrían ser beneficioso para la actividad, decidimos introducir en los triptófanos presentes en **I** y **II** anillos aromáticos diferentemente sustituidos. Dichos anillos se introdujeron en las posiciones C2, C7 y N1 del anillo de indol de las cadenas laterales de los triptófanos. La síntesis de los derivados arilados en C2 y C7 se llevó a cabo mediante reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio, mientras que la arilación en posición N1 se llevó a cabo mediante reacciones de alquilación en medio básico.

Los resultados biológicos obtenidos con dichos compuestos indican que las posiciones C2 y C7 del anillo de indol del Trp son críticas para la actividad ya que tan solo los compuestos sustituidos en dichas posiciones con anillos aromáticos portadores de 1 o 2 grupos ácidos resultaron activos frente a VIH y EV71. El desplazamiento de dichos anillos aromáticos a la posición N1 conduce a compuestos inactivos frente a ambos virus lo que sugiere que el NH del anillo de indol es importante para la actividad ya que podría estar involucrado en la formación de un enlace de hidrógeno con el sitio de unión

Los compuestos más activos (**29** y **36**) frente a VIH son los tetrámeros portadores de anillos aromáticos sustituidos con 2 COOHs en las posiciones C2 (**29**) o C7 (**36**) del anillo de indol. Dichos compuestos resultaron aproximadamente 100 veces más activos frente a VIH que el prototipo mientras que su peso molecular fue considerablemente menor (~1800 Da frente a 3575.84 Da). El trímero **21** con idéntica sustitución en C2, mostró la mejor actividad entre los trímeros sintetizados. Los compuestos C2 sustituidos con anillos aromáticos portadores de 1 COOH en posición *para* fueron más activos que sus homólogos con los COOHs en posición *meta*.

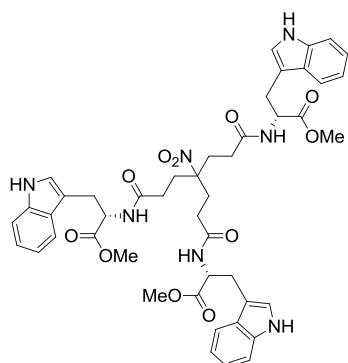
El orden de actividad en cuanto a EV71 fue similar al del VIH a excepción de que en este caso los compuestos sustituidos en posición C2 con anillos aromáticos portadores de 1 COOH en posición *meta* resultaron más activos que los sustituidos con 1 COOH en posición *para*. Los compuestos más activos frente a EV71 (**21**, **27**, **28** y **36**) mostraron actividad similar a la del prototipo **AL-385**, aunque resultaron menos tóxicos que éste por lo que sus índices terapéuticos fueron superiores.

En conclusión, el trabajo desarrollado en el presente capítulo nos ha permitido obtener compuestos de menor peso molecular que el prototipo y con actividad dual frente a la

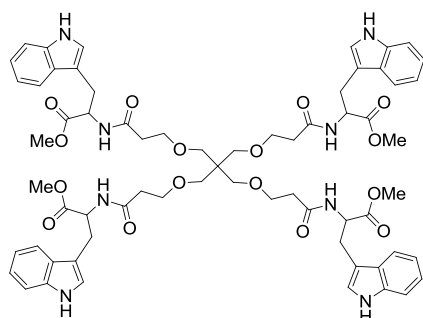
replicación del VIH y EV71. Los prometedores resultados obtenidos con dichos compuestos ponen de manifiesto que son buenos candidatos para continuar los estudios SAR así como su desarrollo terapéutico.

PARTE EXPERIMENTAL

General coupling procedure for the synthesis of the trimer **3 and tetramer **23**.** To a solution containing acid **2**²³ or **22**^{24,25} (1 mmol), HATU (1.2 eq each carboxylic acid group) and H-TrpOMe·HCl (1.2 eq each carboxylic acid group) in DMF (20 mL), DIPEA (3.4 eq each carboxylic acid group) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C for 48 h and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent to give the corresponding compound.

Trimer **3**

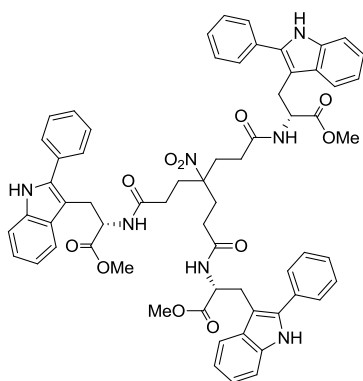
Following the general coupling procedure, compound **2**²³ (500 mg, 1.80 mmol), HATU (2.47 g, 6.49 mmol), H-TrpOMe·HCl (1.65 mg, 6.49 mmol), DIPEA (3.14 mL, 18.03 mmol) afforded 1.53 g (97%) of **3** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.59 (d, J = 6.3 Hz, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.43 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.27–7.24 (m, 3H, Ar), 7.11 (ddt, J = 8.0, 7.0, 0.9 Hz, 3H, Ar), 7.03 (ddt, J = 7.9, 7.0, 1.0 Hz, 3H, Ar), 6.87 (d, J = 2.3 Hz, 3H, Ar), 6.40 (t, J = 8.1 Hz, 3H, NHCO), 4.84 (td, J = 7.1, 5.1 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.27 (dd, J = 14.9, 5.1 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.15 (dd, J = 14.9, 6.8 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.92–1.70 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.865 min.

Tetramer **23**

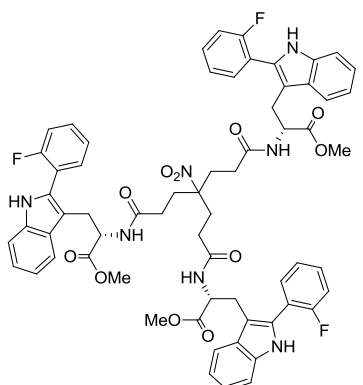
Following the general coupling procedure, compound **22**^{24,25} (200 mg, 0.47 mmol), HATU (0.85 g, 2.26 mmol), H-TrpOMe·HCl (0.55 mg, 2.26 mmol), DIPEA (0.82 mL, 4.71 mmol) afforded 470 mg (82%) of **23** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.29 (d, J = 2.4 Hz, 4H, NH-1ⁱTrp), 7.48 (dd, J = 6.9, 1.9 Hz, 4H, Ar), 7.25–7.19 (m, 4H, Ar), 7.13–7.01 (m, 8H, Ar), 6.96 (d, J = 2.3 Hz, 4H, Ar), 6.79 (d, J = 7.8 Hz, 4H, NHCO), 4.99 (dt, J = 7.7, 4.9 Hz, 4H, α -CHTrp), 3.71 (s, 12H, OCH₃), 3.36 (d, J = 5.0 Hz, 8H, β -CH₂Trp), 3.26–3.17 (m, 4H, OCH₂), 3.13–3.03 (m, 4H, OCH₂), 2.86 (d, J = 9.2 Hz, 4H, OCH₂), 2.47 (d, J = 9.2 Hz, 4H, OCH₂), 2.32–2.16 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.483 min.

General procedure for the synthesis of the C2 arylated trimers 4–12 and tetramers 24–26.

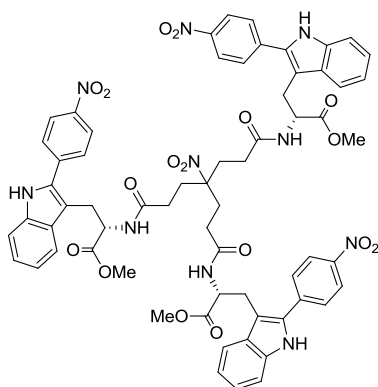
The corresponding compounds with 3 or 4 TrpOMe (1 mmol), aryl iodide (2 eq for each Trp), AgBF₄ (2 eq for each Trp), TFA (1 eq for each Trp) and Pd(OAc)₂ (5% mol) were placed in a microwave reactor vessel in dry DMF (2 mL). The mixture was heated under microwave irradiation (250 W) at 120 °C for 30 min. The resulting suspension was filtered through Whatman[®] filter paper 42, and the solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and washed successively with saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL) and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC using dichloromethane/methanol (20:1) as eluent to give the corresponding compound.

Trimer 4

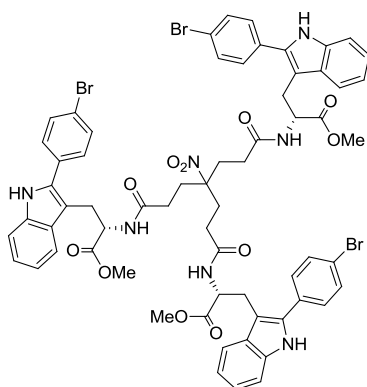
Following the general procedure, compound **3** (50 mg, 0.057 mmol), iodobenzene (38.3 μ L, 0.342 mmol), Pd(OAc)₂ (0.6 mg, 0.003 mmol), AgBF₄ (66.5 mg, 0.342 mmol) and TFA (13.1 μ L, 0.171 mmol) afforded 35.9 mg (56.9%) of **4** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.45 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.53–7.48 (m, 9H, Ar), 7.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H, Ar), 7.35–7.30 (m, 3H, Ar), 7.25 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H, Ar), 7.16–7.11 (m, 3H, Ar), 7.10–7.05 (m, 3H, Ar), 5.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H, NHCO), 4.79–4.74 (m, 3H, α -CHTrp), 3.51 (dd, *J* = 14.7, 5.7 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.44 (dd, *J* = 14.8, 6.0 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.37 (s, 9H, OCH₃), 1.74–1.62 (m, 6H, CH₂), 1.57–1.49 (m, 3H, CH₂), 1.43–1.33 (m, 3H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.999 min.

Trimer 5

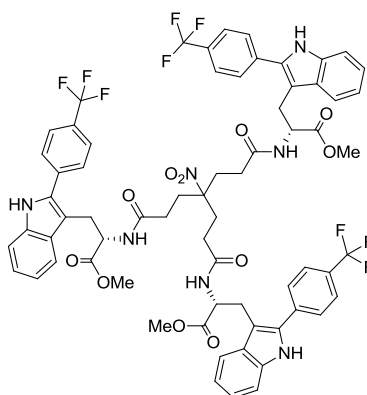
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), 2-fluoroiodobenzene (79 μ L, 0.683 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 38.2 mg (29%) of **5** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.45 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.58–7.47 (m, 6H, Ar), 7.42–7.34 (m, 3H, Ar), 7.30–7.06 (m, 15H, Ar), 5.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H, NHCO), 4.84–4.75 (m, 3H, α -CHTrp), 3.51–3.31 (m, 15H, β -CH₂Trp and OCH₃), 1.82–1.60 (m, 9H, CH₂), 1.56–1.42 (m, 3H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.406 min.

Trimer 6

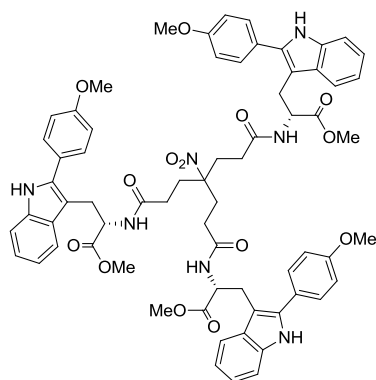
Following the general procedure, compound **3** (50 mg, 0.057 mmol), 1-iodo-4-nitrobenzene (85.2 mg, 0.342 mmol), Pd(OAc)₂ (0.6 mg, 0.003 mmol), AgBF₄ (66.6 mg, 0.342 mmol) and TFA (13 μ L, 0.171 mmol) afforded 33.4 mg (47%) of **6** as an amorphous yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ : 11.51 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.48 (d, J = 7.7 Hz, 3H, NHCO), 8.37–8.26 (m, 6H, Ar), 7.96–7.83 (m, 6H, Ar), 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.40–7.32 (m, 3H, Ar), 7.14 (t, J = 7.6 Hz, 3H, Ar), 7.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ar), 4.59–4.56 (m, 3H, α -CHTrp), 3.52–3.20 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.97–1.72 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.825 min.

Trimer 7

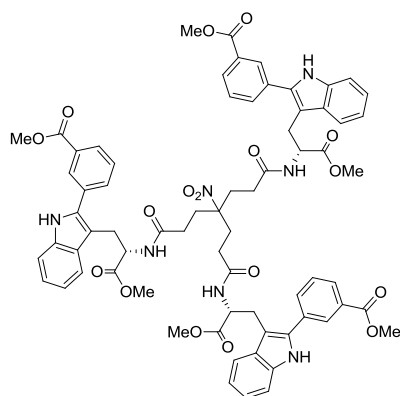
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), 1-bromo-4-iodobenzene (193 mg, 0.683 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 57.3 mg (37%) of **7** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.51–8.44 (m, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.61–7.47 (m, 9H, Ar), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 6H, Ar), 7.30–7.23 (m, 3H, Ar), 7.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H, Ar), 7.08 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ar), 5.95 (d, J = 7.9 Hz, 3H, NHCO), 4.79 (q, J = 6.5 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.52–3.31 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.81–1.40 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.590 min.

Trimer 8

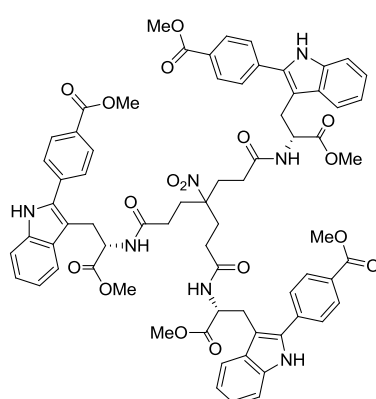
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), 4-iodobenzotrifluoride (186 mg, 0.683 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 48.6 mg (33%) of **8** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.47 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.82 (s, 3H, Ar), 7.76 (d, J = 7.4 Hz, 3H, Ar), 7.66–7.50 (m, 9H, Ar), 7.31–7.25 (m, 3H, Ar), 7.20–7.06 (m, 6H, Ar), 5.97 (d, J = 8.1 Hz, 3H, NHCO), 4.79 (q, J = 6.3 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.54–3.31 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.80–1.42 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.741 min.

Trimer 9

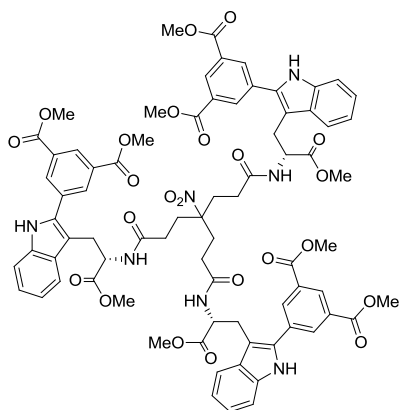
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), 4-iodoanisole (159.9 mg, 0.683 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 51.4 mg (38%) of **9** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.36 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 7.52–7.42 (m, 9H, Ar), 7.28–7.23 (m, 3H, Ar), 7.17–7.03 (m, 6H, Ar), 7.01–6.93 (m, 6H, Ar), 5.87 (d, J = 7.9 Hz, 3H, NHCO), 4.82–4.72 (m, 3H, α -CHTrp), 3.85–3.76 (m, 9H, OCH₃), 3.53–3.35 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.83–1.40 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.447 min.

Trimer 10

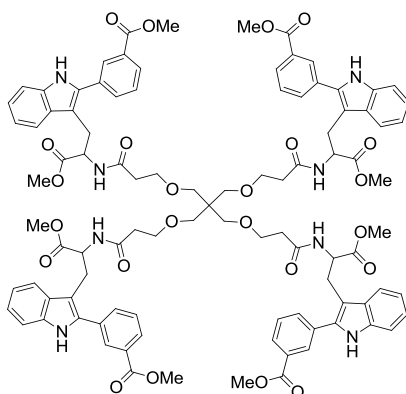
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), methyl 3-iodobenzoate (179.1 mg, 0.683 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 56 mg (38%) of **10** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.58 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.24–8.20 (m, 3H, Ar), 8.01 (dt, J = 7.8, 1.4 Hz, 3H, Ar), 7.77 (dt, J = 7.9, 1.5 Hz, 3H, Ar), 7.56–7.48 (m, 6H, Ar), 7.31–7.27 (m, 3H, Ar), 7.19–7.05 (m, 6H, Ar), 6.01 (d, J = 8.1 Hz, 3H, NHCO), 4.84–4.74 (m, 3H, α -CHTrp), 3.90 (s, 9H, OCH₃), 3.55–3.33 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.82–1.42 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.026 min.

Trimer 11

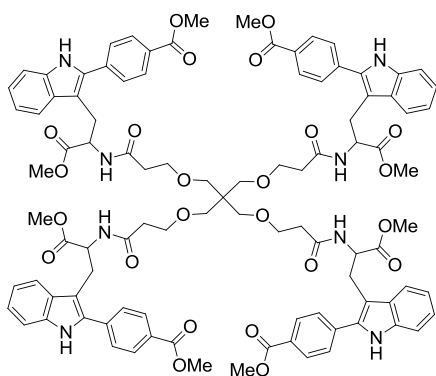
Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), methyl 4-iodobenzoate (179.2 mg, 0.684 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 54.1 mg (37%) of **11** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.73 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.06 (d, J = 8.5 Hz, 6H, Ar), 7.62 (d, J = 8.5 Hz, 6H, Ar), 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.32–7.27 (m, 3H, Ar), 7.18–7.12 (m, 3H, Ar), 7.10–7.04 (m, 3H, Ar), 6.07 (d, J = 8.0 Hz, 3H, NHCO), 4.83–4.76 (m, 3H, α -CHTrp), 3.89 (s, 9H, OCH₃), 3.52 (dd, J = 14.7, 6.2 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.46–3.40 (m, 3H, β -CH₂Trp), 3.39 (s, 9H, OCH₃), 1.73–1.57 (m, 8H, CH₂), 1.51–1.41 (m, 4H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.222 min.

Trimer 12

Following the general procedure, compound **3** (100 mg, 0.114 mmol), dimethyl 5-iodoisophthalate (218 mg, 0.684 mmol), Pd(OAc)₂ (1.3 mg, 0.006 mmol), AgBF₄ (132.97 mg, 0.683 mmol) and TFA (26 μ L, 0.342 mmol) afforded 57.3 mg (35%) of **12** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.89 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.56 (bs, 3H, Ar), 8.38 (d, J = 1.6 Hz, 6H, Ar), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.30–7.24 (m, 3H, Ar), 7.19–7.03 (m, 6H, Ar), 6.19 (d, J = 8.2 Hz, 3H, NHCO), 4.79 (q, J = 6.6 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.90 (s, 18H, OCH₃), 3.51–3.29 (m, 15H, OCH₃ and β -CH₂Trp), 1.78–1.47 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.239 min.

Tetramer 24

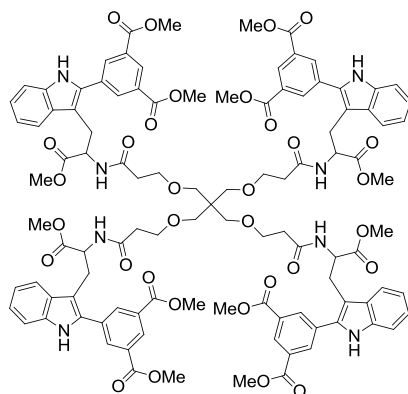
Following the general procedure, compound **23** (120 mg, 0.098 mmol), methyl 3-iodobenzoate (205.3 mg, 0.783 mmol), Pd(OAc)₂ (2.2 mg, 0.01 mmol), AgBF₄ (152.4 mg, 0.783 mmol) and TFA (30 μ L, 0.392 mmol) afforded 67.4 mg (39%) of **24** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.31 (bs, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.26 (bs, 4H, Ar), 7.99–7.92 (m, 4H, Ar), 7.79–7.72 (m, 4H, Ar), 7.56–7.48 (m, 4H, Ar), 7.44 (t, J = 7.7 Hz, 3H, Ar), 7.22–7.14 (m, 4H, Ar), 7.11–6.98 (m, 8H, Ar), 6.58 (d, J = 7.9 Hz, 4H, NHCO), 4.95–4.84 (m, 4H, α -CHTrp), 3.90 (bs, 12H, OCH₃), 3.58–3.41 (m, 8H, β -CH₂Trp), 3.31 (bs, 12H, OCH₃), 3.04–2.93 (m, 4H, OCH₂), 2.92–2.82 (m, 4H, OCH₂), 2.58 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.40 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.05–1.95 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.382 min.

Tetramer 25

Following the general procedure, compound **23** (100 mg, 0.082 mmol), methyl 4-iodobenzoate (171.1 mg, 0.653 mmol), Pd(OAc)₂ (1.8 mg, 0.008 mmol), AgBF₄ (127.1 mg, 0.653 mmol) and TFA (25 μ L, 0.326 mmol) afforded 46.2 mg (32%) of **25** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.39 (s, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.07–7.98 (m, 8H, Ar), 7.68–7.58 (m, 8H, Ar), 7.56–7.47 (m, 4H, Ar), 7.16–6.99 (m, 12H, Ar), 6.55 (d, J = 7.7 Hz, 3H, NHCO), 4.93–4.84 (m, 4H, α -CHTrp), 3.90

(s, 12H, OCH₃), 3.63–3.43 (m, 8H, β -CH₂Trp), 3.36 (d, J = 3.9 Hz, 12H, OCH₃), 2.98–2.88 (m, 4H, OCH₂), 2.87–2.76 (m, 4H, OCH₂), 2.62 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.47 (d, J = 9.2 Hz, 4H, OCH₂), 2.03–1.82 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.246 min.

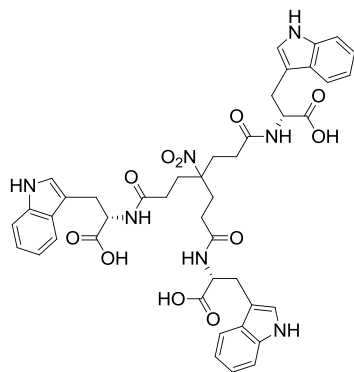
Tetramer 26



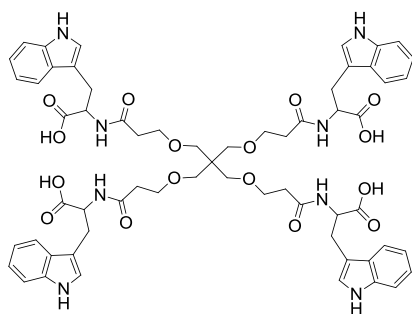
Following the general procedure, compound **23** (120 mg, 0.098 mmol), dimethyl 5-iodoisophthalate (251 mg, 0.783 mmol), Pd(OAc)₂ (2.2 mg, 0.010 mmol), AgBF₄ (152.4 mg, 0.783 mmol) and TFA (30 μ L, 0.392 mmol) afforded 51.7 mg (26%) of **26** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.45 (bs, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.57 (bs, 4H, Ar), 8.43 (d, J = 1.6 Hz, 8H, Ar), 7.56–7.50 (m, 4H, Ar), 7.21–7.15 (m, 4H, Ar), 7.10–6.98 (m, 8H, Ar), 6.62 (d, J = 8.0 Hz, 4H, NHCO), 4.99–4.87 (m, 4H, α -CHTrp), 3.91 (s, 24H, OCH₃), 3.59–3.39 (m, 8H, β -CH₂Trp), 3.31 (bs, 12H, OCH₃), 3.03–2.91 (m, 4H, OCH₂), 2.90–2.82 (m, 4H, OCH₂), 2.49 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.31 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.12–1.96 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.368 min.

General procedure for the deprotection of methyl esters. To a solution containing the corresponding methyl ester derivative (1.0 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C (ice-bath), a solution of LiOH·H₂O (2 eq for each methyl ester group) in water (2 mL) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 4-5 h. Then 1 N hydrochloric acid aqueous solution was added to reach pH = 2, and volatiles were evaporated to dryness. The residue was dissolved in ethyl acetate (20 mL) and washed with H₂O (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was triturated with diethyl ether to afford the pure deprotected derivatives.

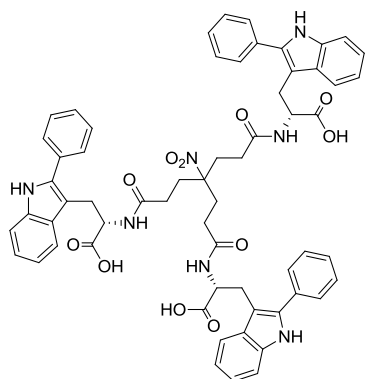
Trimer I



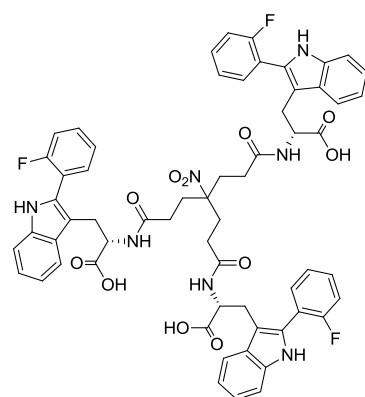
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **3** (100 mg, 0.11 mmol) gave 95 mg (quant) of **I** as an amorphous white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.79 (bs, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.15 (d, J = 7.9 Hz, 3H, NHCO), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.10 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.01 (m, 3H, Ar), 6.94 (m, 3H, Ar), 4.41 (m, 3H, α -CHTrp), 3.13 (dd, J = 14.6, 5.2 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 2.97 (dd, J = 14.6, 8.5 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.97 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ : 174.0, 170.1, 136.5, 127.7, 124.0, 121.3, 118.7, 118.6, 111.8, 110.6, 54.0, 31.0, 29.9, 27.6. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.020 min.

Tetramer II

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **23** (100 mg, 0.082 mmol) gave 95.3 mg (quant) of **II** as an amorphous white solid. ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.13 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, NHCO), 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, Ar), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar), 7.12 (d, $J = 2.3$ Hz, 4H, Ar), 7.1–7.0 (m, 4H, Ar), 7.0–6.9 (m, 4H, Ar), 4.51 (td, $J = 7.9, 5.5$ Hz, 4H, α -CHTrp), 3.39 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H, OCH_2), 3.24–2.90 (m, 12H, β -CH₂Trp and OCH_2), 2.35–2.18 (m, 4H, CH₂). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 175.3, 174.2, 138.0, 129.0, 124.5, 122.5, 119.9, 119.3, 112.5, 110.9, 70.6, 68.0, 45.8, 40.5, 37.4, 28.6. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.700 min. ppm. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for $\text{C}_{61}\text{H}_{69}\text{N}_8\text{O}_{16}$ 1170.4857; found 1170.4815.

Trimer 13

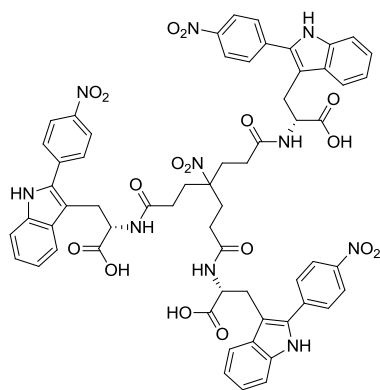
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **4** (60 mg, 0.0542 mmol) gave 57 mg (quant) of **13** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.16 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H, NHCO), 7.62 (d, $J = 7.7$ Hz, 9H, Ar), 7.44 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H, Ar), 7.36–7.26 (m, 6H, Ar), 7.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 6.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, Ar), 4.53 (q, $J = 7.5$ Hz, 3H, α -CHTrp), 3.30 (dd, $J = 14.4, 6.7$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.12 (dd, $J = 14.4, 7.7$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.88–1.70 (m, 12H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 174.0, 171.0, 136.5, 135.9, 133.5, 129.6, 129.3, 128.6, 128.1, 122.1, 119.6, 119.4, 111.7, 108.2, 93.6, 53.8, 31.2, 29.9, 28.0. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.150 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for $\text{C}_{61}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_{11}$ 1063.4116; found 1063.4102.

Trimer 14

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **5** (58 mg, 0.05 mmol) gave 55 mg (quant) of **14** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.24 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H, NHCO), 7.71 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.62–7.56 (m, 3H, Ar), 7.53–7.46 (m, 3H, Ar), 7.42–7.32 (m, 9H, Ar), 7.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 7.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, Ar), 4.50 (q, $J = 7.4$ Hz, 3H, α -CHTrp), 3.22 (dd, $J = 14.4, 6.6$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.11 (dd, $J = 14.4, 7.5$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.95–1.77 (m, 12H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.6, 170.6, 161.0, 158.5, 136.5, 132.4, 132.4, 130.6, 130.6, 130.1,

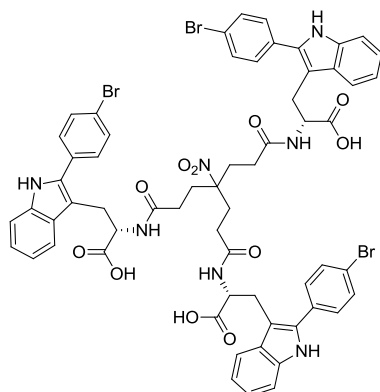
128.4, 125.4, 124.9, 124.9, 122.0, 121.1, 121.0, 119.4, 119.2, 116.5, 116.3, 111.6, 109.7, 93.3, 53.4, 34.9, 31.0, 30.9, 29.6, 29.5, 27.6. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.131 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₁H₅₄F₃N₇O₁₁ 1117.3833; found 1117.3828.

Trimer 15

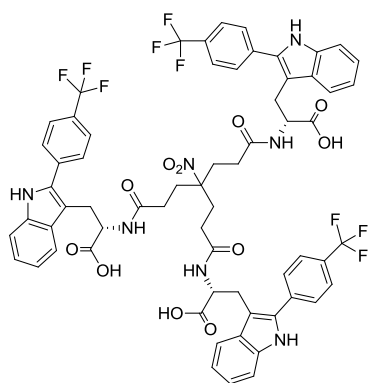


Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **6** (53 mg, 0.043 mmol) gave 51 mg (quant) of **15** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.48 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.36–8.39 (m, 9H, NHCO and Ar), 7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 6H, Ar), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, Ar), 4.57 (q, *J* = 7.5 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.40 (dd, *J* = 14.6, 6.8 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.24 (dd, *J* = 14.5, 7.7 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.94–1.71 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.5, 170.9, 146.4, 139.8, 139.6, 137.0, 133.2, 129.3, 128.9, 125.4, 124.3, 123.2, 119.9, 119.7, 111.9, 111.1, 93.4, 53.4, 34.9, 30.9, 29.7, 29.7, 29.5, 27.8. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.456 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₁H₅₄N₁₀O₁₇ 1198.3668; found 1198.3655.

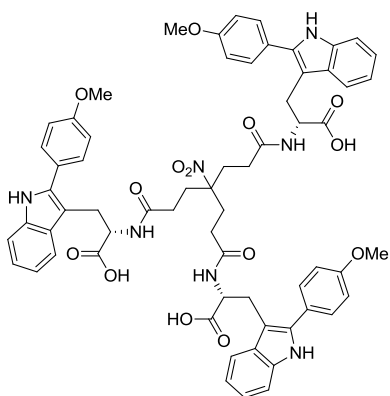
Trimer 16



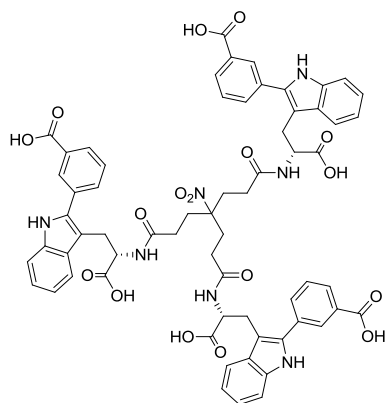
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **7** (61 mg, 0.045 mmol) gave 59 mg (quant) of **16** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.24 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H, NHCO), 7.70–7.64 (m, 9H, Ar), 7.63–7.59 (m, 6H, Ar), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, Ar), 4.55 (q, *J* = 7.5 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.31 (dd, *J* = 14.5, 6.9 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.19–3.10 (m, 3H, β -CH₂Trp), 1.95–1.74 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.7, 170.8, 139.6, 136.4, 134.4, 132.5, 132.0, 130.4, 129.3, 128.5, 125.4, 122.2, 121.1, 119.5, 119.4, 111.6, 108.6, 93.4, 53.5, 49.1, 34.9, 31.0, 30.9, 29.8, 29.7, 27.8, 21.5. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.242 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₁H₅₄Br₃N₇O₁₁ 1297.1431; found 1297.1388.

Trimer 17

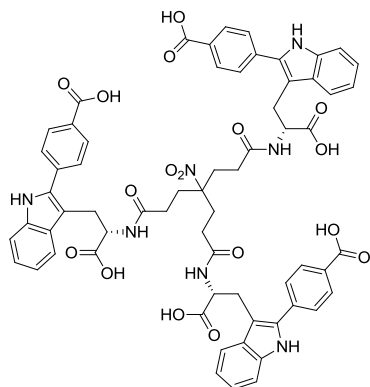
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **8** (57.2 mg, 0.044 mmol) gave 55 mg (quant) of **17** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.38 (s, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H, NHCO), 8.01–7.94 (m, 6H, Ar), 7.74–7.67 (m, 9H, Ar), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H, Ar), 7.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 4.58 (q, $J = 7.5$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.35 (dd, $J = 14.5, 6.8$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.18 (dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 1.93–1.73 (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.6, 170.8, 162.8, 139.6, 136.5, 134.2, 133.8, 132.2, 130.5, 130.2, 129.9, 129.5, 129.2, 128.7, 126.0, 125.4, 124.7, 124.6, 124.3, 124.3, 123.3, 122.5, 120.6, 119.7, 119.5, 111.7, 109.3, 93.4, 53.5, 36.2, 34.9, 31.2, 30.9, 29.7, 28.2, 27.8. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.619 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{64}\text{H}_{54}\text{F}_9\text{N}_7\text{O}_{11}$ 1267.3738; found 1267.3761.

Trimer 18

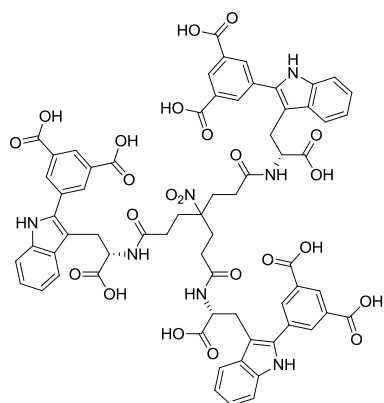
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **9** (50 mg, 0.04 mmol) gave 46 mg (quant) of **18** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.13 (s, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H, NHCO), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 6H, Ar), 7.36 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.14–7.06 (m, 9H, Ar), 7.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, Ar), 4.61 (q, $J = 7.5$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.85 (s, 9H, OCH_3), 3.41–3.30 (m, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.16 (dd, $J = 14.4, 7.6$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.03–1.82 (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.8, 170.8, 159.1, 136.1, 135.7, 129.7, 129.5, 125.7, 121.5, 119.2, 119.1, 114.6, 111.3, 107.1, 93.4, 55.6, 53.6, 31.2, 31.0, 30.9, 29.8, 29.7, 27.9. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.999 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{64}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{14}$ 1153.4433; found 1153.4458.

Trimer 19

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **10** (52 mg, 0.04 mmol) gave 49.2 mg (quant) of **19** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 11.31 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.30 (d, J = 8.2 Hz, 3H, NHCO), 8.18 (bs, 3H, Ar), 7.92 (d, J = 7.7 Hz, 3H, Ar), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.58 (t, J = 7.7 Hz, 3H, Ar), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 6.98 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ar), 4.52 (q, J = 7.5 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.32 (dd, J = 14.4, 7.2 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.14 (dd, J = 14.4, 7.4 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.93–1.70 (m, 12H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.6, 170.8, 167.7, 136.5, 134.7, 133.6, 132.6, 131.9, 129.4, 129.3, 129.2, 128.6, 122.2, 119.5, 119.4, 111.6, 108.6, 93.4, 53.6, 31.0, 29.7, 27.7. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.738 min. HRMS (ESI⁻) m/z : calculated for C₆₄H₅₇N₇O₁₇ 1195.3811; found 1195.3810.

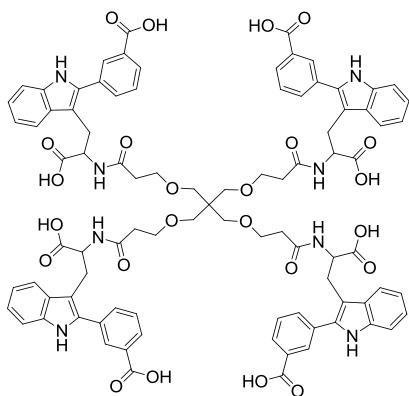
Trimer 20

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **11** (73.7 mg, 0.057 mmol) gave 68 mg (quant) of **20** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.31 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.34 (d, J = 8.2 Hz, 3H, NHCO), 8.02 (d, J = 8.2 Hz, 6H, Ar), 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 6H, Ar), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.33 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.08 (t, J = 7.3 Hz, 3H, Ar), 6.98 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 4.55 (q, J = 7.6 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.34 (dd, J = 14.4, 7.0 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.16 (dd, J = 14.4, 7.6 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.93–1.73 (m, 12H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.6, 170.8, 167.5, 137.4, 136.6, 134.3, 130.06, 129.6, 129.3, 128.2, 122.5, 119.7, 119.4, 111.7, 109.6, 93.3, 53.5, 30.9, 30.9, 29.7, 27.9. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.651 min. HRMS (ESI⁻) m/z : calculated for C₆₄H₅₇N₇O₁₇ 1195.3811; found 1195.3806.

Trimer 21

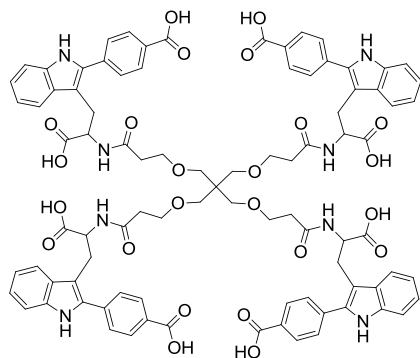
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **12** (35.1 mg, 0.024 mmol) gave 32 mg (quant) of **21** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.43 (s, 3H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.44 (m, 3H, Ar), 8.39–8.36 (m, 6H, Ar), 8.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, NHCO), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, Ar), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H, Ar), 7.13–7.06 (m, 3H, Ar), 7.02–6.96 (m, 3H, Ar), 4.50 (q, $J = 7.5$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.35 (dd, $J = 14.4, 7.8$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.17 (dd, $J = 14.4, 7.0$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 1.97–1.69 (m, 12H, CH_2). ^{13}C

NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.3, 170.8, 167.0, 136.6, 134.2, 133.9, 133.0, 132.3, 129.2, 129.0, 122.4, 119.6, 119.5, 111.7, 109.0, 93.3, 53.4, 31.0, 30.9, 29.7, 27.6. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 3.815 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{67}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_{23}$ 1327.3506; found 1327.3498.

Tetramer 27

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **24** (34.2 mg, 0.019 mmol) gave 32 mg (quant) of **27** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.32 (s, 4H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.24–8.17 (m, 8H, NHCO and Ar), 7.92 (t, $J = 8.5$ Hz, 8H, Ar), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar), 7.58 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H, Ar), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, Ar), 6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, Ar), 4.59 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H, $\alpha\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.42–3.24 (m, 12H, OCH_2 and $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.15 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 4H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.07 (bs, 8H, OCH_2), 2.28–2.06 (m, 8H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.7, 170.5, 167.7, 136.5, 134.8, 133.6, 132.6, 131.8,

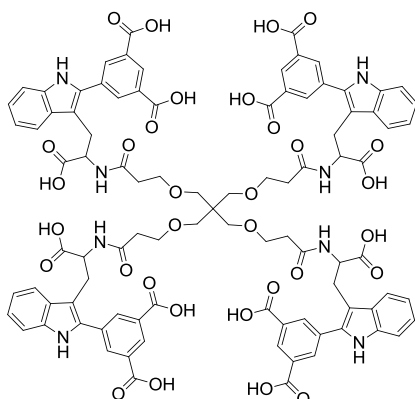
129.4, 129.3, 128.5, 122.2, 119.5, 119.3, 111.6, 108.6, 69.2, 67.4, 53.4, 45.2, 36.1, 27.9. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 4.846 min. HRMS (ESI $^+$) m/z : calculated for $\text{C}_{89}\text{H}_{84}\text{N}_8\text{O}_{24}$ 1648.5598; found 1648.5609.

Tetramer 28

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **25** (35.7 mg, 0.02 mmol) gave 33 mg (quant) of **28** as an amorphous white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.32 (s, 4H, $\text{NH}-1^{\text{i}}\text{Trp}$), 8.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, NHCO), 8.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 8H, Ar), 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 8H, Ar), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, Ar), 7.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, Ar), 7.00 (t,

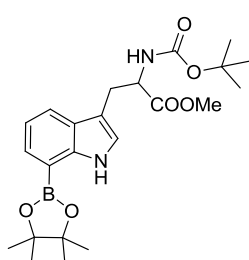
$J = 7.5$ Hz, 4H, Ar), 4.63 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H, α -CHTrp), 3.44–3.22 (m, 12H, OCH₂ and β -CH₂Trp), 3.22–3.14 (m, 4H, β -CH₂Trp), 3.03 (bs, 8H, OCH₂), 2.27–2.09 (m, 8H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.7, 170.6, 167.6, 137.4, 136.7, 134.4, 130.1, 129.6, 129.3, 128.2, 122.6, 119.7, 119.4, 111.7, 109.6, 69.2, 67.3, 53.4, 45.2, 36.1, 28.1. HPLC [gradient: A:B, 10–100% of A in 10 min]: 5.235 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₈₉H₈₄N₈O₂₄ 1648.5598; found 1648.5589.

Tetramer 29



Following the general procedure for the deprotection of methyl esters, compound **26** (31 mg, 0.016 mmol) gave 28 mg (quant) of **29** as an amorphous white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.40 (s, 4H, NH-1^HTrp), 8.44–8.42 (m, 4H, Ar), 8.37–8.34 (m, 8H, Ar), 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, NHCO), 7.64 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H, Ar), 7.11–7.06 (m, 4H, Ar), 6.01–6.95 (m, 4H, Ar), 4.51 (q, $J = 7.4$ Hz, 4H, α -CHTrp), 3.39–3.23 (m, 12H, OCH₂ and β -CH₂Trp), 3.15 (dd, $J = 14.4, 6.9$ Hz, 4H, β -CH₂Trp), 3.09–3.02 (m, 8H, OCH₂), 2.19 (dt, $J = 14.1, 6.8$ Hz, 4H, CH₂), 2.10 (dt, $J = 14.0, 6.5$ Hz, 4H, CH₂). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ : 173.40, 170.36, 167.03, 136.58, 134.16, 134.01, 133.00, 132.42, 129.08, 128.98, 122.39, 119.61, 119.42, 111.71, 108.93, 69.28, 67.40, 53.24, 45.20, 36.04, 27.58. HPLC [gradient: A:B, 10–100% of A in 10 min]: 3.756 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₉₃H₈₄N₈O₃₂ 1824.5192; found 1824.5198.

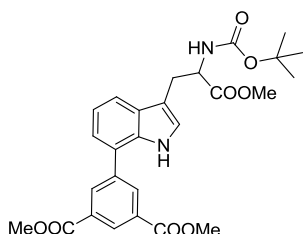
(S)-Methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-indol-3-yl)propanoate (**32**)



N-Boc-L-tryptophan methyl ester **30** (0.60 g, 1.88 mmol, 1 eq), (1,5-cyclooctadiene)(methoxy)iridium(I) dimer ([Ir(cod)OMe]₂) (31.2 mg, 47 μ mol, 2.5 mol %), and 4,4'-di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridine (dtbpy) (25.2 mg, 94.2 μ mol, 5% mol) were sealed in a microwave tube under argon atmosphere and anhydrous tetrahydrofuran (5 mL) was added. To the resulting dark-brown solution pinacolborane (HBpin) (1.36 mL, 9.42 mmol, 5 eq) was added in a single portion via a syringe, and the resulting red solution was stirred at 60 °C overnight. After cooling to 23 °C and removal of volatiles under reduced pressure, the subsequent brown residue was dissolved in MeOH/THF (4.7 mL/3.7 mL) and Bi(OAc)₃ (145.4 mg, 0.376 mmol, 20 mol %) was added. The mixture was stirred under argon at 80 °C for 12 h, then cooled to 23 °C and filtered through a Whatman® filter paper 42 with ethyl acetate (50 mL) as eluent. The filtrate was washed with saturated aqueous NaHCO₃ solution (50 mL), and the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting brown residue was purified by flash column

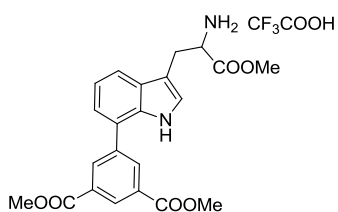
chromatography on silica gel using hexane/ethyl acetate (4:1) as eluent, to provide 450.8 mg (47%) of compound **32** as a white solid. Melting point and spectroscopic characteristics of **32** with consistent with those found in the literature.^{21,22}

(S)-Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(7-(3,5-dimethoxycarbonyl-1-phenyl)-1H-indol-3-yl)propanoate (33)

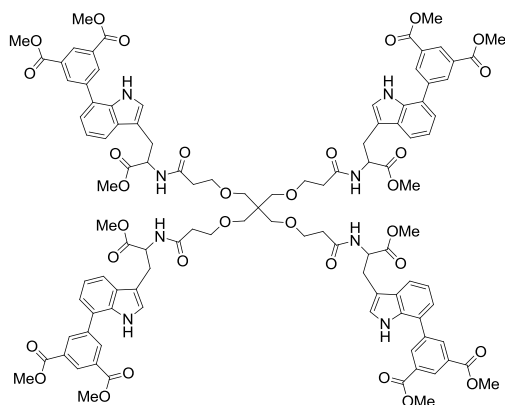


A dry microwave tube was charged sequentially with 7-borotryptophan **32** (150 mg, 0.337 mmol, 1 eq), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) (15.46 mg, 16.9 μmol , 5 mol %), SPhos (27.67 mg, 67.4 μmol , 20% mol), and tribasic potassium phosphate (214.6 mg, 1.01 mmol, 3 eq), sealed, and placed under an argon atmosphere. Then, anhydrous toluene (3 mL) and dimethyl 5-bromoisophthalate (110.4 mg, 0.404 mmol, 1.2 eq) were added via syringe. The reaction mixture was stirred at 80 °C overnight, then was cooled to 23 °C and filtered through Whatman® filter paper 42 with dichloromethane (20 mL) as eluent. The filtrate was washed with H_2O (3 \times 20 mL), and the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting brown residue was purified by CCTLC using hexane/ethyl acetate (4:1) as eluent to provide 95.9 mg (56%) of compound **33** as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.68 (t, J = 1.6 Hz, 1H, Ar), 8.48 (d, J = 1.7 Hz, 2H, Ar), 8.38 (bs, 1H, $\text{NH-}^1\text{Trp}$), 7.60 (dd, J = 7.4, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.28–7.20 (m, 2H, Ar), 7.06 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar), 5.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NHCO), 4.72–4.64 (m, 1H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.97 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.39–3.26 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 1.43 (s, 9H, CH_3). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.613 min.

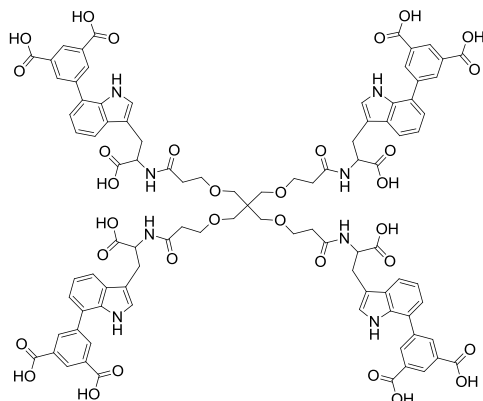
(S)-Methyl 2-amino-3-(7-(3,5-dimethoxycarbonyl-1-phenyl)-1H-indol-3-yl)propanoate (34)



To a cold (0 °C) solution of compound **33** (170 mg, 0.333 mmol) in dichloromethane (15 mL), TFA (1mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 5 h, then volatiles were evaporated to dryness and the residue was co-evaporated successively with methanol and dichloromethane to give 172.3 mg (quant) of compound **34** in salt form. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ : 11.18 (d, J = 2.9 Hz, 1H, $\text{NH-}^1\text{Trp}$), 8.50 (t, J = 1.6 Hz, 1H, Ar), 8.36 (d, J = 1.6 Hz, 2H, Ar), 7.57 (dd, J = 6.9, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.28 (d, J = 2.5 Hz, 1H, Ar), 7.23–7.15 (m, 2H, Ar), 4.35 (t, J = 6.2 Hz, 1H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.92 (s, 6H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.31 (d, J = 6.2 Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.798 min.

Tetramer 35

To a solution containing the tetrapodal polyacid **22** (26 mg, 63.6 μ mol, 1 eq) in DMF (20 mL), the amine **34** (160 mg, 0.31 mmol, 4.8 eq), HATU (116 mg, 0.31 mmol, 4.8 eq) and DIPEA (0.13 mL, 0.763 mmol, 12 eq) were added. The reaction mixture was stirred at 30 °C during 2 days and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with aqueous solutions of citric acid (10%) (3 x 20 mL), saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent, to afford 67.9 mg (53.5%) of compound **35** as an amorphous white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.26 (d, J = 2.5 Hz, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.61 (t, J = 1.6 Hz, 4H, Ar), 8.43 (d, J = 1.6 Hz, 8H, Ar), 7.49 (dd, J = 6.3, 2.8 Hz, 4H, Ar), 7.17–7.09 (m, 8H, Ar), 6.96 (d, J = 2.4 Hz, 4H, Ar), 6.79 (d, J = 7.9 Hz, 4H, NHCO), 4.82 (dt, J = 7.7, 5.2 Hz, 4H, α -CHTrp), 3.90 (s, 24H, OCH₃), 3.60 (s, 12H, OCH₃), 3.34–3.21 (m, 16H, OCH₂ and β -CH₂Trp), 3.08 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.93 (d, J = 9.3 Hz, 4H, OCH₂), 2.31–2.13 (m, 8H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.658 min.

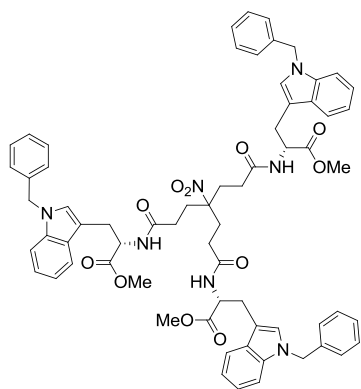
Tetramer 36

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above mentioned, compound **35** (46 mg, 23.1 μ mol) afforded 41.8 mg (quant) of compound **36** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.93 (bs, 4H, NH-1ⁱTrp), 8.49 (t, J = 1.6 Hz, 4H, Ar), 8.33 (d, J = 1.6 Hz, 8H, Ar), 8.19 (d, J = 7.7 Hz, 4H, NHCO), 7.60 (dd, J = 7.0, 2.0 Hz, 4H, Ar), 7.18 (d, J = 2.4 Hz, 4H, Ar), 7.16–7.09 (m, 8H, Ar), 4.55 (q, J = 7.1 Hz, 4H, α -CHTrp), 3.50–3.43 (m, 8H, OCH₂), 3.23–3.15 (m, 12H, OCH₂ and β -CH₂Trp), 3.11–3.03 (m, 4H, β -CH₂Trp), 2.40–2.24 (m, 8H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.7, 170.7, 167.1, 140.1, 133.7, 133.4, 132.5, 129.0, 128.9, 125.1, 123.9, 121.9, 119.7, 119.0, 111.1, 69.3, 67.6, 53.4, 45.4, 36.2, 27.8. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.198 min. HRMS (ESI⁺) m/z : calculated for C₉₃H₈₄N₈O₃₂ 1824.5192; found 1824.5214.

General procedure for the synthesis of N1 benzyl derivatives 37–39 y 43. To a solution containing the corresponding trimer **3** or tetramer **23** (1.0 mmol) in acetonitrile anhydrous (10

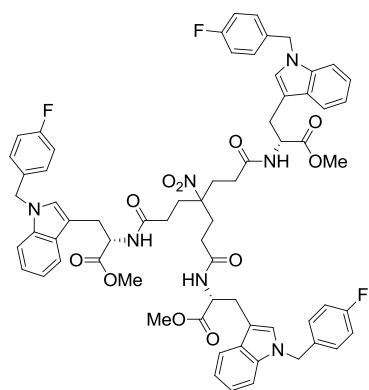
mL), Cs_2CO_3 (1.5 eq for each Trp) was added and the mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. Then the corresponding benzyl bromide (1.2 eq for each Trp) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 6 h. The mixture was evaporated to dryness, dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed successively with citric acid (3 x 20 mL) and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was purified on a Biotage HPFC (High Performance Flash Chromatography) purification system on reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent.

Trimer 37

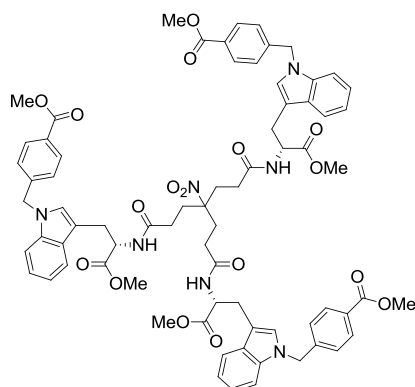


Following the general procedure, compound **3** (200 mg, 0.23 mmol), Cs_2CO_3 (335.6 mg, 1.03 mmol) and benzyl bromide (118.9 μL , 1.03 mmol) afforded 87.2 mg (33%) of **37** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.52–7.47 (m, 3H, Ar), 7.30–7.20 (m, 12H, Ar), 7.15–7.04 (m, 12H, Ar), 6.90 (d, $J = 2.7$ Hz, 3H, Ar), 6.13–6.08 (m, 3H, NHCO), 5.25 (bs, 6H, CH_2Bn), 4.90–4.83 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.36–3.19 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.14–1.90 (m, 12H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.566 min.

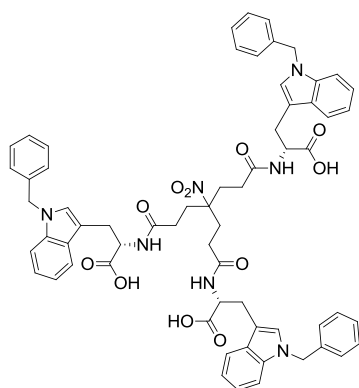
Trimer 38



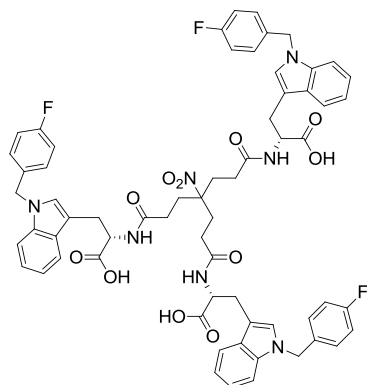
Following the general procedure, compound **3** (200 mg, 0.23 mmol), Cs_2CO_3 (335.6 mg, 1.03 mmol) and 4-fluorobenzyl bromide (127.7 μL , 1.03 mmol) afforded 116.1 mg (42%) of **38** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.41–7.57 (m, 3H, Ar), 7.23–7.17 (m, 3H, Ar), 7.16–7.05 (m, 6H, Ar), 7.05–6.98 (m, 6H, Ar), 6.99–6.91 (m, 6H, Ar), 6.89 (bs, 3H, Ar), 6.22–6.09 (m, 3H, NHCO), 5.21 (s, 6H, CH_2Bn), 4.91–4.80 (m, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.32–3.15 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.16–1.90 (m, 12H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 8.517 min.

Trimer 39

Following the general procedure, compound **3** (200 mg, 0.23 mmol), Cs₂CO₃ (335.6 mg, 1.03 mmol) and methyl 4-(bromomethyl)benzoate (235.03 mg, 1.03 mmol) afforded 99.8 mg (33%) of **39** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.95–7.88 (m, 6H, Ar), 7.52–7.47 (m, 3H, Ar), 7.16–7.04 (m, 15H, Ar), 6.93–6.91 (m, 3H, Ar), 6.25–6.21 (m, 3H, NHCO), 5.29 (bs, 6H, CH₂Bn), 4.89–4.82 (m, 3H, α-CHTrp), 3.33–3.17 (m, 6H, β-CH₂Trp), 2.13–1.90 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.619 min.

Trimer 40

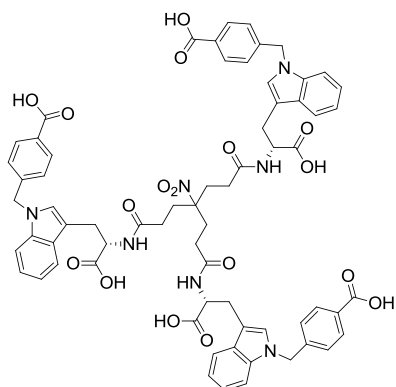
Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above mentioned, compound **37** (60 mg, 0.05 mmol) gave 57.1 mg (quant) of **40** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.28–8.19 (m, 3H, NHCO), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.26–7.14 (m, 12H, Ar), 7.12–7.07 (m, 6H, Ar), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, Ar), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, Ar), 5.30 (bs, 6H, CH₂Bn), 4.46 (q, *J* = 7.3 Hz, 3H, α-CHTrp), 3.15 (dd, *J* = 14.7, 5.4 Hz, 3H, β-CH₂Trp), 2.97 (dd, *J* = 14.6, 8.4 Hz, 3H, β-CH₂Trp), 2.04–1.87 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ: 173.3, 170.6, 138.3, 136.0, 128.5, 127.9, 127.5, 127.3, 126.9, 121.3, 118.8, 118.6, 110.1, 110.0, 93.2, 53.1, 49.0, 30.7, 29.3, 27.1. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.382 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₄H₆₃N₇O₁₁ 1105.4586; found 1105.4583.

Trimer 41

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above mentioned, compound **38** (113.9 mg, 0.09 mmol) gave 109.3 mg (quant) of **41** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.27–8.21 (m, 3H, NHCO), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.33 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 3H, Ar), 7.25 (s, 3H, Ar), 7.18–7.12 (m, 6H, Ar), 7.10–7.01 (m, 9H, Ar), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, Ar), 5.30 (bs, 6H, CH₂Bn), 4.49–4.41 (m, 3H, α-CHTrp), 3.14 (dd, *J* = 14.7, 5.6 Hz, 3H, β-CH₂Trp), 2.98 (dd, *J* = 14.6, 8.2 Hz, 3H, β-CH₂Trp), 2.06–1.92 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ: 173.3, 173.3, 170.6, 170.6, 162.6, 160.2, 135.8, 134.5, 134.5, 129.0, 128.9, 127.9, 127.4, 121.3, 118.8, 118.7, 115.4, 115.1, 110.1, 93.3, 53.2, 53.1, 48.2,

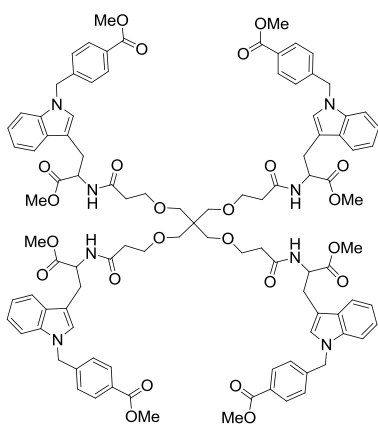
30.6, 29.3, 27.1. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 7.771 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₄H₆₀F₃N₇O₁₁ 1159.4303; found 1159.4293.

Trimer 42

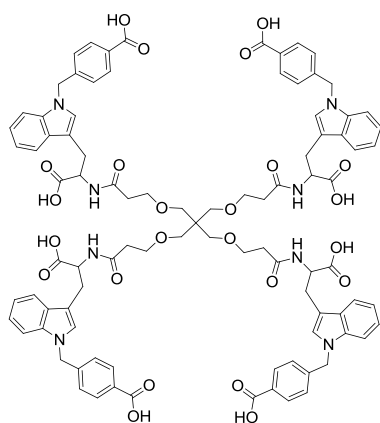


Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above mentioned, compound **39** (79.2 mg, 0.06 mmol) gave 73.9 mg (quant) of **42** as an amorphous white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.28–8.23 (m, 3H, NHCO), 7.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 6H, Ar), 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, Ar), 7.31–7.25 (m, 6H, Ar), 7.19–7.13 (m, 6H, Ar), 7.06–6.95 (m, 6H, Ar), 5.40 (bs, 6H, CH₂Bn), 4.46 (q, *J* = 7.2 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.14 (dd, *J* = 14.6, 5.9 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.00 (dd, *J* = 14.5, 7.9 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 2.06–1.92 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 173.3, 170.6, 167.1, 143.4, 135.9, 129.8, 129.6, 128.0, 127.6, 126.9, 121.4, 118.9, 118.7, 110.2, 93.3, 53.2, 48.7, 30.6, 29.3, 27.2. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 5.380 min. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calculated for C₆₇H₆₃N₇O₁₇ 1237.4280; found 1237.4279

Tetramer 43



Following the general procedure for the synthesis of N1 benzyl derivatives, compound **23** (200 mg, 0.163 mmol), Cs₂CO₃ (318.9 mg, 0.98 mmol) and methyl 4-(bromomethyl)benzoate (224.3 mg, 0.98 mmol) afforded 91.9 mg (31%) of **43** as an amorphous solid of cream color. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 8H, Ar), 7.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 4H, Ar), 7.01–7.24 (m, 20H, Ar), 6.95 (s, 4H, Ar), 6.95–6.845 (m, 4H, NHCO), 5.30 (s, 8H, CH₂Bn), 4.97 (m, 4H, α -CHTrp), 3.90 (s, 12H, OCH₃), 3.59 (s, 12H, OCH₃), 3.52–3.40 (m, 12H, OCH₂, β -CH₂Trp), 3.33–3.24 (m, 4H, β -CH₂Trp), 3.20–3.09 (m, 8H, OCH₂), 2.42–2.30 (m, 8H, CH₂).

Tetramer 44

Following the general procedure for the deprotection of methyl esters above mentioned, compound **43** (74.1 mg, 0.04 mmol) gave 69.5 mg (quant) of **44** as an amorphous white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ : 8.23 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, NH). 7.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 8H, Ar), 7.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H, Ar), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H, Ar), 7.23 (s, 4H, Ar), 7.13 (d, $J = 7.8$ Hz, 8H, Ar), 7.05-6.98 (m, 4H, Ar), 6.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H, Ar), 5.36 (s, 8H, CH_2Bn), 4.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.41-3.28 (m, 8H, OCH_2), 3.14 (dd, $J = 14.5$ y 5.6 Hz, 4H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.07 (s, 8H, OCH_2), 2.98 (dd, $J = 14.7$ y 8.0 Hz, 4H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 2.22 (m, 8H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 22.2, 28.1, 49.3, 54.1, 67.7, 69.6, 110.6, 111.0, 119.4, 122.0, 127.4, 128.1, 128.6, 130.2, 130.6, 136.5, 143.9, 167.8, 170.7, 174.1. HPLC [gradient: A:B, 2-100% of A in 15 min]: 3.83 min. HRMS (ESI $^-$) m/z : calculated for $\text{C}_{93}\text{H}_{92}\text{N}_8\text{O}_{24}$ 1704.6225; found 1704.6267.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz-Rodríguez, J.; Albericio, F.; Lavilla, R. Postsynthetic modification of peptides: Chemoselective C-arylation of tryptophan residues. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 1124-1127.
2. Preciado, S.; Mendive-Tapia, L.; Albericio, F.; Lavilla, R. J. Synthesis of C-2 arylated tryptophan amino acids and related compounds through palladium-catalyzed C-H activation. *Org. Chem.* **2013**, 78, 8129-8135.
3. Park, F.; Gopalsamy, A.; Aplasca, A.; Ellingboe, J. W.; Xu, W.; Zhang, Y.; Levin, J. I. Synthesis and activity of tryptophan sulfonamide derivatives as novel non-hydroxamate TNF- α converting enzyme (TACE) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3857-3865.
4. Plešec, K. K.; Urbancić, D.; Gobec, M.; Pekošak, A.; Tomašić, T.; Anderluh, M.; Mlinarić-Raščan, I.; Jakopin, Z. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 5221-5234.
5. Zhang, M-Z.; Chen, Q.; Yang, G-F. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 421-441.
6. De Sa Alves, F.R.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure', *Mini Rev. Med. Chem.* **2009**, 9, 782-793.
7. Evans, B.E.; Rittle, K.E.; Bock, M.G.; DiPardo, R.M.; Freidinger, R.M.; Whitter, W.L.; Lundell, G.F.; Veber, D.F.; Anderson, P.S.; Chang, R.S.; Lotti, V.J.; Cerino, D.J.; Chen, T.B.; Kling, P.J.; Kunkel, K.A.; Springer, J.P.; Hirshfield, J. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2235-2246.
8. Welsch, M.E.; Snyder, S.A.; Stockwell, B.R.; Privileged scaffolds for library design and drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 347-361.
9. Deprez, N. R.; Kalyani, D.; Krause, A.; Sanford, M. S. Room temperature palladium-catalyzed 2-arylation of indoles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4972-4973.
10. Lebrasseur, N.; Larrosa, I. Room temperature and phosphine free palladium-catalyzed direct C-2 arylation of indoles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 130, 2926-2927.
11. T. Yanagi, N. Miyaura and A. Suzuki. The palladium-catalyzed cross-coupling reaction of phenylboronic acid with haloarenes in the presence of bases. *Synth. Commun.*, **1981**, 11, 513.
12. S. W. Wright, D. L. Hageman and L. D. McClure. Fluoride-mediated boronic acid coupling reactions. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6095.
13. Suzuki, A. Carbon-carbon bonding made easy. *Chem. Commun.* **2005**, 4759-4763.
14. A. F. Littke, C. Dai and G. C. Fu. Versatile catalysts for the Suzuki Cross-Coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4020.

15. S. Saito, M. Sakai, N. Miyaura. A synthesis of biaryls via Nickel(0) catalyzed cross-coupling reaction of chloroarenes with phenylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2993.
16. A.N. Nesmeyanov, R.A. Sokolik, *Methods of Elemento-Organic Chemistry*, vol. 1, North-Holland, Amsterdam, **1967**
17. Ishiyama, T.; Miyaura, N. Chemistry of Group 13 element-transition metal linkage the platinum and palladium catalyzed reactions of (alkoxo)diborons *J. Organomet. Chem.* **2000**, 611, 392–402.
18. Murata, M.; Oyama, T.; Watanabe, S.; Masuda, Y. Palladium-catalyzed borylation of aryl halides or triflates with dialkoxymborane: A novel and facile synthetic route to arylboronates. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 164–168.
19. Cho, J.-Y.; Tse, M. K.; Holmes, D.; Maleczka, R. E., Jr.; Smith, M. R., III. Steric and chelate directing effects in aromatic borylation. *Science*, **2002**, 295, 305–307.
20. Robbins, D. W.; Boebel, T. A.; Hartwig, J. F. Iridium-catalyzed, silyl-directed borylation of nitrogen containing heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4068-4069.
21. Loach, R. P.; Fenton, O. S.; Amaike, K.; Siegel, D. S.; Ozkal, E.; Movassaghi, M. C7-desativatization of C3-alkylindoles including tryptophans and tryptamines. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 11254-11263.
22. Shen, F.; Tyagarajan, S.; Perera, D.; Krska, S. W.; Maligres, P. E.; Smith, M. R., III; Maleczka, R. E., Jr. Bismuth acetate as a catalyst for the sequential protodeboration of di- and triborylated indoles. *Org. Lett.* **2016**, 18, 1554-1557.
23. Ornelas, C.; Broichhagen, J.; Weck, M. Strain-promoted alkyne azide cycloaddition for the functionalization of poly(amide)-based dendrons and dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 3923-3931.
24. Flores, A.; Camarasa, M.-J.; Pérez-Pérez, M.-J.; San-Félix, A.; Balzarini, Jan.; Quesada, Ernesto. Multivalent agents containing 1-substituted 2,3,4-trihydroxyphenyl moieties as novel synthetic polyphenols directed against HIV-1. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 5278–5294.
25. Newkome, G.; Weis, C. D. 6,6-bis(Carboxy-2-oxabutyl)-4,8-dioxaundecane-1,11-dicarboxylic acid. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1996**, 28, 242.
26. Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Arnout, J.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, 85, 6132-6136.
27. Balzarini, J.; Laethem, K.V.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T., Schols, D. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compounds for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human Immunodeficiency virus. *J. Virol.* **2007**, 81, 362-373.

28. Andries, K., Dewindt, B., Snoeks, J., Willebrords, R., Van Eemeren, K., Stokbroekx, R., Janssen, P. A. J. In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob Agents Chemother*, **1992**, 36, 100–107.

Capítulo 4. Estudio sobre el mecanismo de acción frente a EV71

Como se ha venido comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, a fecha de hoy en nuestro grupo de investigación disponemos de compuestos con actividad nano-picomolar frente a cepas clínicas de enterovirus 71¹ y submicromolar frente a VIH. La actividad dual y la elevada potencia antiviral de dichos compuestos los convierte en candidatos muy prometedores para su posterior desarrollo terapéutico.

Hasta el momento disponemos de dos prototipos, el primero es el dendrímero **AL-385** (Figura 1), con un esqueleto central de pentaeritritol, espaciadores trivalentes y 12 triptófanos con los grupos ácidos libres (COOH) en la periferia. Dentro de las modificaciones estructurales llevadas a cabo a partir de dicho prototipo, las más exitosas fueron aquellas en las que se eliminaron los espaciadores trivalentes y se unieron anillos aromáticos sustituidos con 1 o 2 COOHs a las posiciones C2 o C7 del anillo de indol de los Trps. Dichas modificaciones condujeron a los trímeros y tetrámeros descritos en el capítulo 3 de esta memoria, cuyo prototipo es el trímero **AL-470** (compuesto **21** en el capítulo 3) (Figura 1) que posee mejor actividad frente a VIH (un orden de magnitud) y similar actividad frente a EV71 que **AL-385**. Este nuevo prototipo tiene numerosas ventajas con respecto al anterior, el dendrímero **AL-385**. En primer lugar, tal y como se puede observar en la Figura 1, el tamaño del compuesto **AL-470** es bastante menor que el de **AL-385** (1328.20 Da frente a 3575.84 Da) por lo que es probable que sus propiedades farmacocinéticas sean más adecuadas para los ensayos biológicos. Además, el grupo NO₂ presente en el punto focal de **AL-470** puede transformarse en un grupo NH₂ y de esta forma la molécula tendría un punto de diversidad para su derivatización, algo difícil de conseguir con el dendrímero **AL-385**.

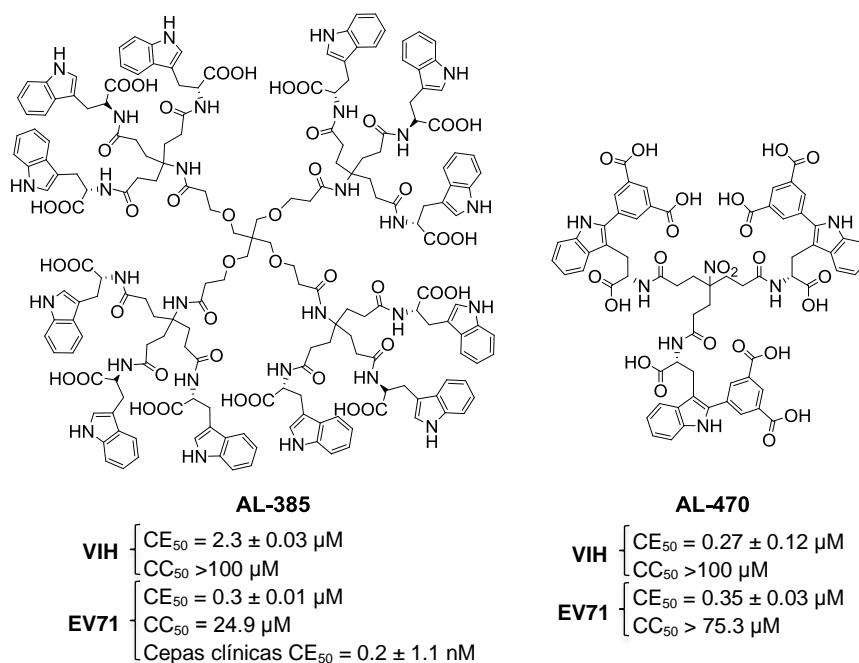


Figura 1. Estructuras de los compuestos prototipo **AL-385** y **AL-470**

Con los dos prototipos mencionados, **AL-385** (dendrímico) y **AL-470** (trimero) se están llevando a cabo distintos estudios biológicos para determinar su mecanismo de acción frente a EV71 así como su actividad *in vivo* en un modelo de ratón infectado por EV71. Los resultados biológicos obtenidos hasta el momento, junto con la síntesis de los derivados más adecuados para llevar a cabo los ensayos biológicos, se describen en el presente capítulo.

Ensayos biológicos llevados a cabo con el dendrímico AL-385

Experimento de tiempo de adición

Una vez confirmada la actividad anti-EV71 del prototipo **AL-385**, nos planteamos determinar en qué fase del ciclo replicativo del virus ejerce su acción dicho compuesto. Para ello, se llevó a cabo un experimento de tiempo de adición² que consiste en añadir el compuesto en estudio al cultivo celular a distintos tiempos tras el inicio de la infección, tiempos que a su vez se corresponden con distintas etapas del ciclo replicativo del virus.

En el ensayo se emplearon como referencia distintos compuestos cuyo mecanismo de acción frente a EV71 es bien conocido, tales como rupintrivir, un inhibidor de la proteasa 3C³ y pirodávir, un inhibidor de entrada.⁴

Tal y como se observa en la Figura 2, los resultados del ensayo indican que tanto pirodávir como el compuesto **AL-385** deben añadirse al cultivo antes (-1 hora) o justo (0 horas) en el momento de la infección para que no aparezca ARN viral (ausencia de barras).⁵ Si la adición se demora 1 hora ya se empieza a observar en ambos casos la aparición de ARN viral (barras grises y blancas). Sin embargo, la adición del inhibidor de proteasa rupintrivir puede demorarse hasta 5 horas, pasado ese tiempo ya se empieza a observar ARN viral (barra negra).

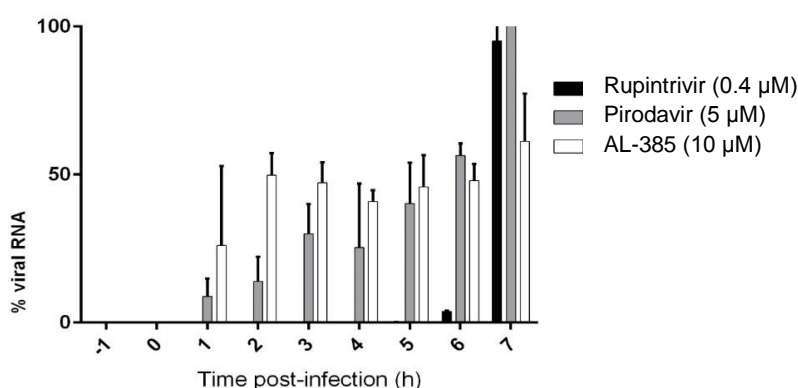


Figura 2. Ensayo de tiempo de adición con el compuesto **AL-385**

Por tanto, el comportamiento del compuesto **AL-385** es similar al del pirodávir, e indica que **AL-385** inhibe una etapa temprana del ciclo replicativo del EV71, y más en concreto la entrada del virus en la célula huésped. En base a estos resultados se podría postular que el

compuesto **AL-385** podría unirse al virus e inactivarlo aunque también podría ocurrir que dicho compuesto se uniera a un receptor celular impidiendo la entrada del virus en la célula huésped. Se están llevando a cabo distintos estudios para aclarar esta cuestión, alguno de los cuales se recogen a continuación.

Estabilidad de la partícula viral

Es bien conocido que los inhibidores de la entrada viral que se unen al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1, tales como pirodavis, actúan estabilizando la cápsida viral y protegiendo al virus de la desintegración y pérdida de infectividad a altas temperaturas.⁶

Para determinar si el compuesto **AL-385** tiene algún efecto sobre la estabilidad de la partícula viral se llevó a cabo un experimento de termo-estabilidad en el que se observa la infectividad viral a medida que se incrementa la temperatura. En el ensayo se emplearon como compuestos de referencia el pirodavis, un inhibidor de la entrada que se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1 y la suramina,⁷ un inhibidor de entrada para el que se ha propuesto una interacción con la región de carga positiva de la cápsida.⁸

Tal y como se observa en la Figura 3, tanto en presencia de **AL-385** (línea roja) como de la suramina (línea azul), la infectividad viral disminuye (el virus se desintegra) a medida que aumenta la temperatura, mientras que en presencia del pirodavis la infectividad viral se mantiene. Por tanto, parece que el comportamiento de **AL-385** es similar al de la suramina y distinto al del pirodavis, de lo que se deduce que **AL-385** no se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1 y que podría interaccionar con la región de carga positiva de la cápsida viral.

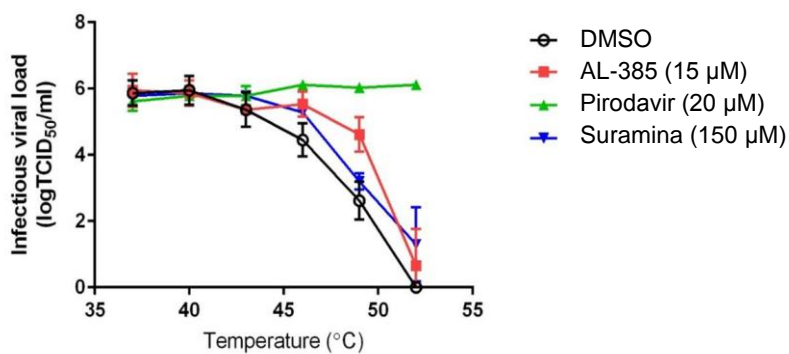


Figura 3. Experimento de termo-estabilidad en presencia de **AL-385**, pirodavis y suramina

Selección y caracterización de cepas virales resistentes

Una de las aproximaciones que se emplea para establecer la diana de un compuesto antiviral es la selección de cepas virales resistentes al compuesto en estudio, seguido de la secuenciación de dichas cepas e identificación de los residuos mutados. La relevancia de esas

mutaciones se confirma mediante expresión de las cepas mutadas, obtenidas por mutagénesis dirigida (crear mutaciones puntuales en una cadena de ADN) y los estudios de sensibilidad de dichas cepas al compuesto en estudio.⁹ De este modo se puede establecer cuál es la proteína o proteínas implicadas en la acción antiviral del compuesto. Por tanto, se trata de un camino largo y tedioso pero que ofrece resultados con un alto grado de fiabilidad.

El grupo del Prof. Johan Neyts realizó estudios de selección de cepas de virus resistentes al compuesto **AL-385**, de caracterización de las mismas y los estudios de mutagénesis dirigida que podrían ayudar a establecer la diana o dianas virales para dicho compuesto.

Los resultados de los que disponemos hasta el momento indican que tras varios pases a una concentración 10 μM ($33 \times \text{CE}_{50}$) de **AL-385** en cultivo celular, se obtuvieron dos cepas virales resistentes (P1, st1 y P1, st2).

En la Figura 4, se observa que no hay cambios significativos en las células control en ausencia (panel 1A) y en presencia (panel 1B) del compuesto **AL-385**. La infección de las células control con el virus silvestre conduce a la muerte celular como se observa en el panel 2A. Sin embargo, la adición del compuesto **AL-385** (10 $\mu\text{g/mL}$) inhibe casi por completo el efecto citopático del virus (panel 2B). Por el contrario, no se observa ningún cambio en las células infectadas con las cepas de virus resistentes (P1, st1 y P2, st2; paneles 3A y 4A) tras adición de la misma cantidad de compuesto (paneles 3B y 4B). Este hecho indica que ambas cepas son menos sensibles a la acción inhibitoria del compuesto **AL-385** que el virus silvestre.

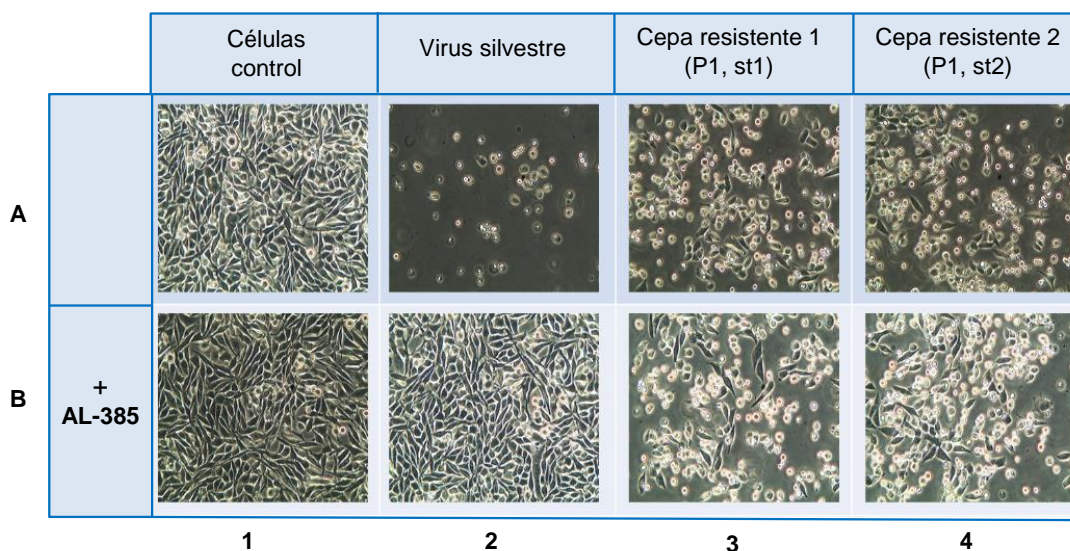


Figura 4. (1A) células control en ausencia del compuesto **AL-385**; (1B) células control en presencia del compuesto **AL-385**; (2A) células infectadas con el virus silvestre; (2B) células infectadas con el virus silvestre en presencia del compuesto **AL-385**; (3A) células infectadas con la cepa de virus resistente 1 (P1, st1); (3B) células infectadas con la cepa de virus resistente 1 (P1, st1) en presencia del compuesto **AL-385**; (4A) células infectadas con la cepa de virus resistente 2 (P2, st2); (4B) células infectadas con la cepa de virus resistente 2 (P2, st2) en presencia del compuesto **AL-385**

La posterior caracterización de las dos cepas resistentes al compuesto **AL-385** mediante estudios de secuenciación de ARN, mostraron la existencia, en cada una de ellas, de dos mutaciones que afectan a dos aminoácidos que se encuentran en las posiciones 184 y 246 de la proteína estructural VP1 situada en la cápsida viral. Estas dos mutaciones corresponden a la serina de la posición 184 que se reemplaza por treonina y a la prolina de la posición 246 que se reemplaza por serina en las cepas mutas respectivamente (S184T y P246S) (Figura 5). Estos dos aminoácidos se localizan en una región de la proteína estructural VP1 situada alrededor del eje central de la unidad icosaédrica que posee carga positiva. Esta región está muy expuesta al medio y juega un papel muy importante en la unión del virus al receptor celular.

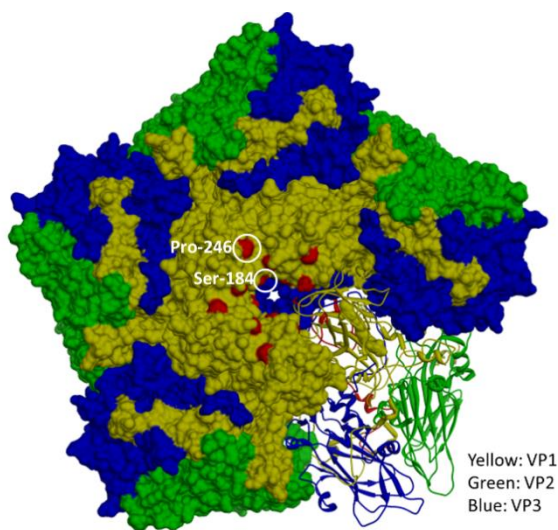


Figura 5. Mutaciones encontradas en una unidad icosaédrica de EV71

En la literatura existen algunos ejemplos de compuestos aniónicos que interaccionan con la carga positiva de los residuos situados en dicha región,^{10,11} entre ellos la suramina. En base a ello, se podría postular que el carácter polianiónico de nuestros compuestos podría favorecer la interacción con aminoácidos situados en la zona positiva de la proteína VP1 de la cápsida viral, impidiendo de este modo que el EV71 se una a su receptor celular y en consecuencia, evitar la entrada del virus en la célula y su posterior replicación.

Seguidamente, mediante técnicas de mutagénesis dirigida se crearon virus recombinantes (VP1_S184T, VP1_P246S y VP1_S184T_P246S) cuya sensibilidad frente al dendrímero **AL-385** y a tres inhibidores de la entrada (vapendavir,¹² pirodavir⁴ y suramina⁷) se determinó a continuación. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1. Tal y como se observa en dicha tabla, los virus recombinantes VP1_S184T, VP1_P246S y VP1_S184T_P246S son menos susceptibles (13, 0.9 y 41) a la acción inhibitoria de **AL-385** que el virus silvestre, mientras que la susceptibilidad de dichos virus frente a los inhibidores de entrada vapendavir, pirodavir y suramina fue mayor.

Tabla 1. Resistencia cruzada frente a distintos inhibidores de entrada

Cepas EV71	AL-385 CE ₅₀ ^a (μM)	Vapendavir CE ₅₀ ^a (μM)	Pirodavir CE ₅₀ ^a (μM)	Suramina CE ₅₀ ^a (μM)
Virus silvestre (BrCr)	0.30 ± 0.01	1.91 ± 0.16	0.35 ± 0.07	3.78 ± 0.06
VP1_S184T	3.69 ± 0.12 (13)	1.93 ± 0.17 (1)	0.28 ± 0.06 (0.8)	4.53 ± 0.22 (1.2)
VP1_P246S	0.24 ± 0.12 (0.9)	1.47 ± 0.55 (0.7)	0.24 ± 0.10 (0.7)	3.28 ± 0.37 (0.9)
VP1_S184T_P246S	11.4 ± 6.8 (41)	2.12 ± 0.32 (1.1)	0.41 ± 0.10 (1.2)	3.76 ± 0.15 (1.0)

^aCE₅₀: concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

() = aumento relativo de la CE₅₀ con respecto a la obtenida con el virus silvestre (no mutado)

Este resultado sugiere que **AL-385** no comparte el mismo sitio de unión que el resto de los inhibidores de entrada descubiertos hasta el momento y por lo tanto pertenece a una familia farmacológica diferente. Este hecho es importante no solo para determinar el sitio de unión de nuestros compuestos con el EV71, sino también para diseñar posibles modalidades terapéuticas (combinaciones simultáneas o alternativas) para su empleo en el tratamiento de las infecciones por EV71.

Ensayos biológicos llevados a cabo con el trímero AL-470

Con el segundo prototipo descrito en el capítulo 3 de esta memoria (**AL-470**), se llevó a cabo, en primer lugar, un experimento de resistencia cruzada con los virus recombinantes descritos en el apartado anterior. Como se observa en la Tabla 2, los virus recombinantes (VP1_S184T, VP1_P246S y VP1_S184T_P246S) son más susceptibles a la acción inhibitoria del compuesto **AL-470** (3.7, 3.1, 3.4) que a la de **AL-385** (13, 0.9, 41). Este resultado sugiere que **AL-470** podría actuar en un punto próximo, aunque ligeramente distinto al de **AL-385**. Teniendo en cuenta que el tamaño de los compuestos es muy diferente, no sería de extrañar que la superficie de interacción de ambos no fuera la misma aunque si podría solapar.

Tabla 2. Resistencia cruzada frente al compuesto AL-470

Cepas EV71	AL-385 CE ₅₀ ^a (μM)	AL-470 CE ₅₀ ^a (μM)
Virus silvestre (BrCr)	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.03
VP1_S184T	3.69 ± 0.12 (13)	2.35 ± 0.60 (3.7)
VP1_P246S	0.24 ± 0.12 (0.9)	1.96 ± 0.04 (3.1)
VP1_S184T_P246S	11.4 ± 6.8 (41)	2.18 ± 0.08 (3.4)

^aCE₅₀: concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

() = aumento relativo de la CE₅₀ con respecto a la obtenida con el virus silvestre (no mutado)

Sin ninguna duda, los experimentos de selección y caracterización de cepas virales resistentes al compuesto **AL-470**, ya iniciados, serán de gran ayuda para aclarar esta cuestión.

Estudios de fluorescencia

Mientras se obtienen resultados concluyentes de los estudios de resistencia, decidimos llevar a cabo experimentos de fluorescencia con el fin de determinar tanto la presencia como la distribución del compuesto **AL-470** en la cápsida viral. Para dicho estudio se empleó como herramienta un derivado fluorescente de **AL-470** cuya síntesis se llevó a cabo a partir del compuesto **3** con un grupo NH₂ en su punto focal al que se unió la fluoresceína como marca fluorescente (Figura 6).

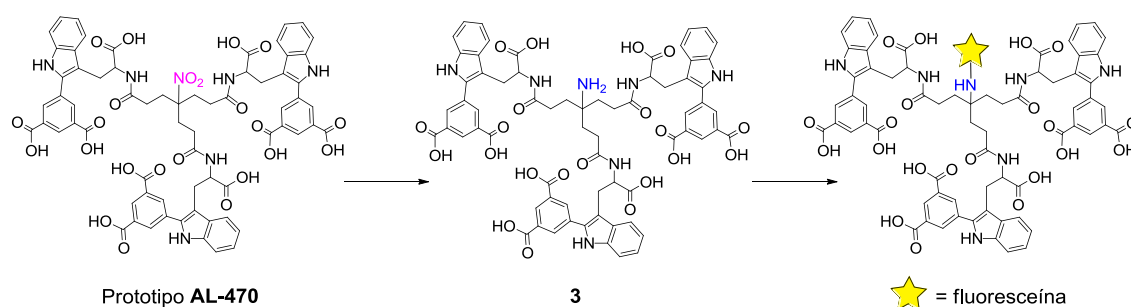
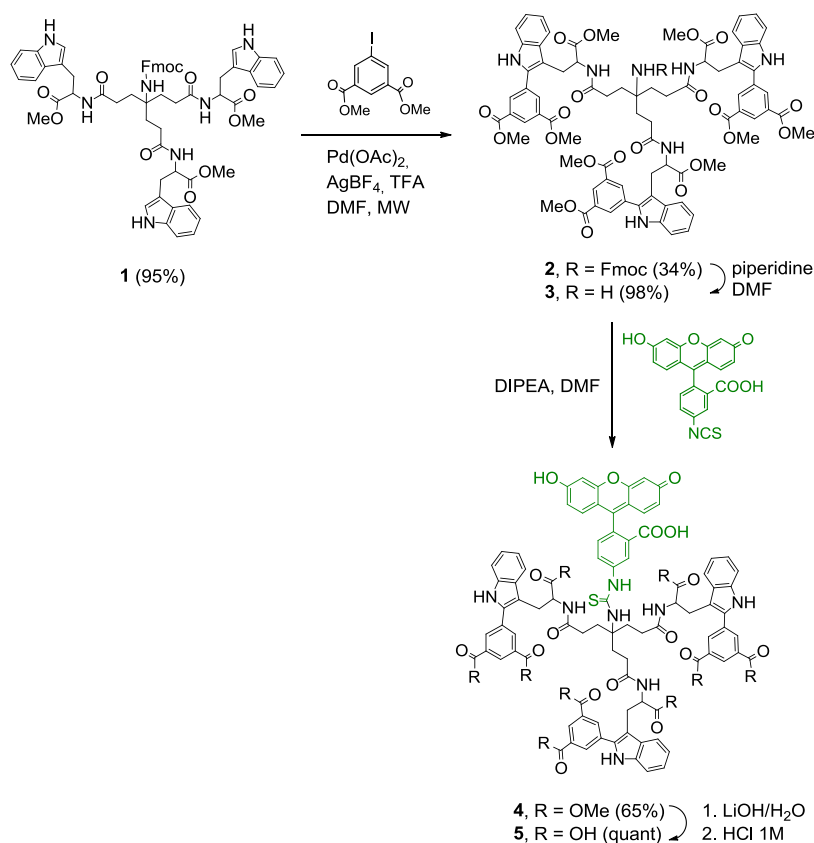


Figura 6. Estructura general del compuesto fluorescente

Según se muestra en el Esquema 1, para la síntesis de dicho compuesto se partió del dendrón **1**, NH-Fmoc protegido en su punto focal y cuya síntesis se describió en el capítulo 1 (compuesto **14**) de la presente Tesis Doctoral. La introducción de los grupos fenildicarboxilato en la posición C2 del anillo de indol de los triptófanos presentes en **1** se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas en el capítulo 3 de esta memoria.¹³ Así, una disolución del compuesto **1** en DMF se hizo reaccionar a 120 °C mediante el uso de microondas, con 5-yodo dimetilisofalato (6 eq) en presencia de Pd(OAc)₂ (5% molar), AgBF₄ (6 eq) y TFA (3 eq), para dar el compuesto **2** con un 34% de rendimiento (Esquema 1). El tratamiento en medio básico (piperidina/DMF) de **2** condujo al compuesto **3** con un grupo amino libre en su punto focal, cuya posterior reacción con isotiocianato de fluoresceína comercial, en presencia de DIPEA como base, condujo al derivado fluorescente **4** con un 65% de rendimiento. La saponificación (LiOH/H₂O, HCl 1M) de los ésteres metílicos presentes en **4** condujo al compuesto fluorescente deseado **5** con rendimiento cuantitativo.


 Esquema 1. Síntesis del derivado fluorescente **5**

En primer lugar, el compuesto **5** se evaluó frente a la replicación de EV71 en cepas de laboratorio (BrCr) y de ratón (812) empleando células de rabdomiosarcoma (RD). Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 3, donde se han incluido como referencia los compuestos prototipo **AL-385** y **AL-470**.

Como se observa en la Tabla 3, el compuesto fluorescente **5** resultó 8 y 16 veces, respectivamente, más activo que los compuestos de referencia **AL-385** y **AL-470** frente a cepas de laboratorio (BrCr), lo que demuestra que es un buen candidato para iniciar ensayos de fluorescencia. Por otra parte, el aumento de actividad observado para el compuesto **5**, con un grupo voluminoso en su punto focal, es de interés para futuros estudios SAR ya que sugiere que este tipo de sustituyentes podrían tener un efecto beneficioso para la actividad. En la actualidad se están preparando compuestos de este tipo para confirmar dicha hipótesis.

Finalmente, merece la pena destacar que los tres compuestos ensayados, **AL-385**, **AL-470** y el derivado fluorescente **5**, son significativamente más activos frente a la cepa de ratón (812) que frente a la cepa de laboratorio (BrCr). Ya se había observado para el compuesto **AL-385** diferencia de actividad significativa entre las cepas clínicas aisladas de pacientes y la cepa de laboratorio.¹ El origen de estas diferencias está siendo investigado en la actualidad.

Tabla 3. Datos de actividad de los compuestos **AL-385**, **AL-470** y **5** frente a cepas de laboratorio (BrCr) y de ratón (812) en células RD

Compuesto	EV71 BrCr CE ₅₀ ^a (μM)	EV71 ratón 812 CE ₅₀ ^a (μM)	CC ₅₀ ^b (μM)
AL-385	0.30 ± 0.01	0.001 ± 0.0003	30 ± 2.5
AL-470	0.35 ± 0.03	0.059 ± 0.003	>75
5	0.039 ± 0.001	0.004 ± 0.0005	>60

^aCE₅₀: concentración efectiva 50 o concentración efectiva de compuesto que consigue proteger el 50% de las células del efecto citopático de virus.

^bCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

Ante los buenos datos de actividad encontrados para el compuesto **5**, llevamos a cabo el experimento de fluorescencia propuesto. En dicho ensayo se utiliza una técnica de inmunofluorescencia secundaria o indirecta que hace uso de dos anticuerpos: el anticuerpo primario que reconoce y se une a la molécula diana, en nuestro caso la proteína VP1 viral, y el anticuerpo secundario que se encuentra marcado con un fluoróforo y es capaz de reconocer al anticuerpo primario y unirse a él. Tal y como se muestra en la Figura 6, en nuestro caso el anticuerpo secundario marcado (color rojo) se une a la proteína estructural VP1 del virus unido a la superficie de la célula viva (color azul) donde se encuentra el anticuerpo primario.

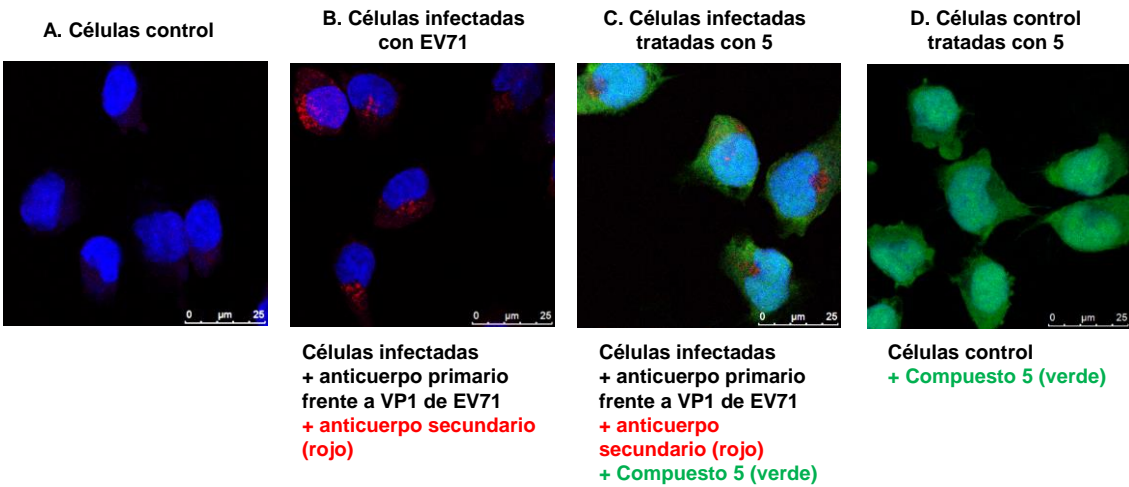
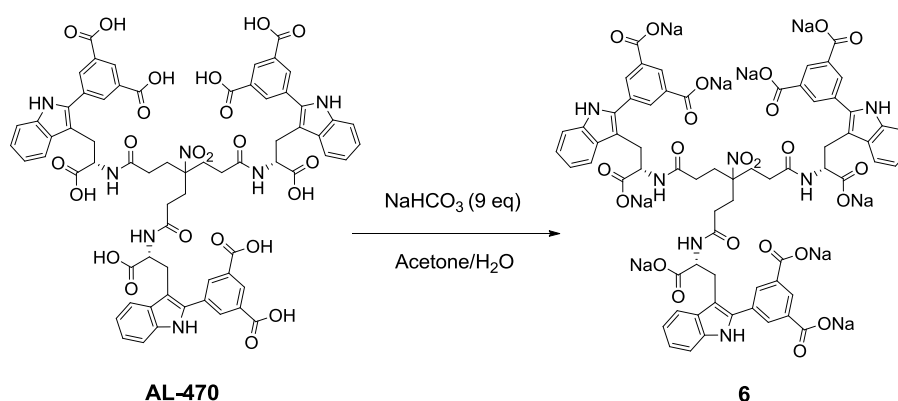


Figura 6. Estudios de fluorescencia llevados a cabo con el compuesto **5**

Desafortunadamente el resultado del experimento no fue concluyente ya que el compuesto **5** (color verde) muestra un elevado grado de depósito inespecífico en toda la superficie celular. Uno de los motivos podría ser la elevada concentración (6 μM) de compuesto empleada en el experimento, por lo que éste va a ser repetido a concentraciones más bajas.

Estudios de solubilidad y estabilidad química

A la vista de los buenos resultados de actividad obtenidos para el compuesto **AL-470** y debido a que su tamaño es considerablemente menor que el del prototipo **AL-385**, pensamos que podría ser más adecuado para llevar a cabo ensayos *in vivo*. Para ello habría que emplear un derivado de **AL-470** que fuera más soluble en medio acuoso. Con esta finalidad, se preparó la sal sódica de **AL-470** (compuesto **6**). Así, tal y como se muestra en el Esquema 2, el tratamiento de **AL-470** con bicarbonato sódico (NaHCO_3), en una mezcla acetona/agua (1:9), condujo a la sal sódica deseada **6**.

Esquema 2. Síntesis de la sal sódica **6**

Para cuantificar el aumento de solubilidad de la sal sódica **6** con respecto al compuesto **AL-470**, se llevaron a cabo estudios de solubilidad termodinámica de ambos compuestos utilizando PBS (pH 7.4) como buffer. Para ello se prepararon dos disoluciones saturadas en PBS, una de cada compuesto, y se agitaron durante 24 horas. Las absorbancias de dichas disoluciones se midieron a una longitud de onda de 330 nm con un espectrofotómetro UV-Vis. Dichas medidas fueron extrapoladas a las correspondientes rectas de calibrado obtenidas con los datos de absorbancia de muestras con concentraciones de compuesto conocidas. De esta forma se determinó que la solubilidad en PBS del compuesto **AL-470** es de 1 g/L (0.75 mM), mientras que la solubilidad de su sal sódica (**6**) es de 74.6 g/L (48.9 mM). Este estudio pone de manifiesto que el compuesto **6** es un buen candidato para iniciar ensayos *in vivo* debido a su alta solubilidad en medio acuoso.

Con el fin de obtener información adicional sobre la estabilidad química del compuesto **6**, nos propusimos llevar a cabo estudios de estabilidad a distintos pHs. En concreto se realizaron estudios a pH 1.5, 5.5 y 7.4 empleando disoluciones tampón de HCl/NaCl, AcOH/AcONa y PBS respectivamente. Los ensayos de estabilidad se realizaron mediante HPLC-Ms, analizando alícuotas de cada una de las disoluciones a diferentes periodos de tiempo (0, 2, 6 y 24 horas). Los datos obtenidos confirman que el compuesto **6** es estable a los pHs ensayados ya que en HPLC el área de la señal correspondiente al compuesto permanece constante en el tiempo a los diferentes pHs.

Los ensayos *in vivo* llevados a cabo con el compuesto **6** ya se han iniciado y estamos a la espera de los resultados.

CONCLUSIONES

En nuestro grupo de investigación hemos descubierto compuestos con actividad nanomolar frente a cepas clínicas de EV71 y submicromolar frente a VIH. Hasta el momento disponemos de dos prototipos. El primero es el dendrímero **AL-385**, con un esqueleto central de pentaeritritol, espaciadores trivalentes y 12 triptófanos con los grupos ácidos libres en la periferia. El segundo prototipo es el trímero **AL-470** con 3 triptófanos en la periferia sustituidos, cada uno de ellos, en la posición C2 del anillo de indol con un grupo fenildicarboxílico.

En el presente capítulo se describen los estudios biológicos llevados a cabo hasta el momento para determinar tanto el mecanismo de acción frente a EV71 como la actividad *in vivo* de estos dos prototipos (**AL-385** y **AL-470**). Las principales conclusiones son las siguientes:

Con respecto al dendrímero **AL-385**

En primer lugar se llevó a cabo un experimento de tiempo de adición con el dendrímero **AL-385** que indicó que dicho compuesto inhibe una etapa temprana del ciclo replicativo de EV71 y más concretamente la entrada del virus en la célula huésped. Además, se llevó a cabo un ensayo de termo-estabilidad observando para **AL-385** un comportamiento similar a la suramina, un inhibidor de entrada para el que se ha propuesto que interacciona con la región de carga positiva de la cápsida viral, y distinto al del pirodavir, un inhibidor de entrada que se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1. Este resultado sugiere que **AL-385** no se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1 y debe su acción inhibitoria a otro tipo de interacción con la cápsida viral.

Ante la presión del compuesto **AL-385** se seleccionaron dos cepas virales resistentes, cuya caracterización reveló la existencia de mutaciones en dos aminoácidos de la proteína estructural VP1 (S184T y P246S). Una vez identificadas estas mutaciones se crearon virus recombinantes mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Estos virus recombinantes fueron menos susceptibles a la acción inhibitoria de **AL-385** que el virus no mutado, mientras que no se observaron cambios significativos a la acción de otros inhibidores de entrada (varendavir, pirodavir y suramina). Este resultado sugiere que **AL-385** no comparte el mismo sitio de unión que el resto de los inhibidores de entrada y por lo tanto pertenece a una familia farmacológica diferente.

Con respecto al trímero **AL-470**

Con el segundo prototipo (**AL-470**) se llevó a cabo un experimento de resistencia cruzada en el que se observó que los virus recombinantes fueron más susceptibles a la acción inhibitoria de **AL-470** que a la acción de **AL-385**. Este resultado sugiere que el punto de

interacción de ambos compuestos no es el mismo aunque si podría estar cerca o incluso solapar.

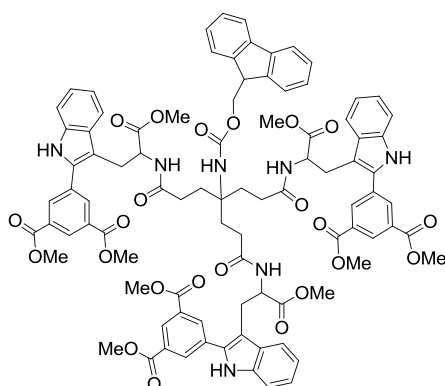
Con el fin de determinar tanto la presencia como la localización del compuesto **AL-470** en la cápsida viral, se están llevando a cabo experimentos de fluorescencia. Para ello, ha sido necesario sintetizar un derivado fluorescente marcado con fluoresceína. Dicho compuesto resultó 8 y 16 veces respectivamente más activo que los prototipos **AL-385** y **AL-470** frente a EV71, lo que demuestra que es un buen candidato para llevar a cabo los ensayos de fluorescencia propuestos.

Finalmente, nos propusimos realizar ensayos *in vivo* en un modelo de ratón infectado por EV71. Para ello, fue necesario preparar un compuesto más soluble en medio acuoso que el prototipo **AL-470**. En concreto se preparó la sal sódica de **AL-470** (compuesto **6**) que resultó 74 veces más soluble que **AL-470** en disolución acuosa (PBS). Además, estudios de estabilidad química mostraron que la sal sódica de **AL-470** es estable con el tiempo a distintos pHs (1.5, 5.5 y 7.4). Estos resultados ponen de manifiesto que el compuesto **6** es un buen candidato para iniciar ensayos *in vivo*.

Los ensayos descritos en el presente capítulo representan tan solo los primeros pasos para conocer el mecanismo de acción frente EV71 y la actividad *in vivo* de nuestros compuestos. El camino que aún queda por recorrer es largo aunque confiamos en disponer pronto de resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

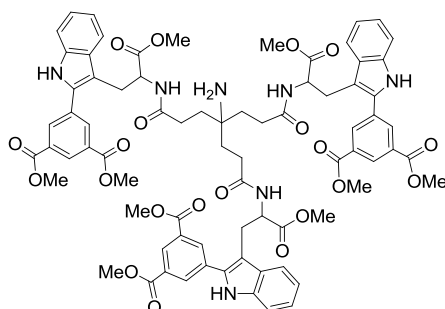
Fmoc protected trimer (2)



Compound **1** (compound **14** in chapter 1) (150 mg, 0.14 mmol), dimethyl 5-iodoisophthalate (269 mg, 0.84 mmol), AgBF_4 (164 mg, 0.84 mmol), TFA (32 μL , 0.42 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (1.57 mg, 5% mol) were placed in a microwave reactor vessel in dry DMF (4 mL). The mixture was heated under microwave irradiation (250 W) at 120 $^\circ\text{C}$ for 30 min. The resulting suspension was filtered through Whatman[®] filter paper 42, and the solvent was removed under vacuum. The residue was

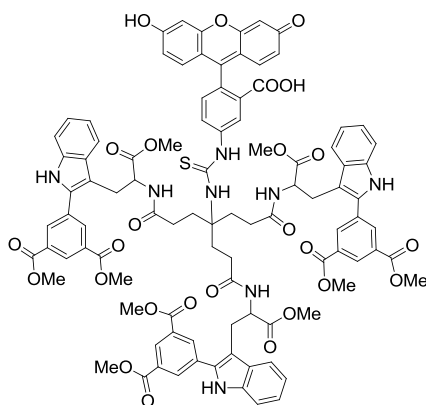
dissolved in ethyl acetate (20 mL) and washed successively with saturated NaHCO_3 (3 x 20 mL) and brine (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC using dichloromethane/methanol (20:1) as eluent to afford 78 mg (34%) of **2** as an amorphous solid of cream color. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.74 (s, 3H, NH-1^{Trp}), 8.57 (bs, 3H, Ar), 8.40 (bs, 6H, Ar), 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 7.60–7.47 (m, 3H, Ar), 7.40–7.17 (m, 8H, Ar), 7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 7.04 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, Ar), 6.16 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H, NHCO), 4.81 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 4.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH_2), 4.04 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, CH), 3.90 (s, 18H, OCH_3), 3.43 (s, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$ and OCH_3), 3.33 (dd, $J = 14.8, 6.9$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 1.73–1.49 (m, 6H, CH_2), 1.44–1.22 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 50-100% of A in 10 min]: 8.166 min.

Amine 3

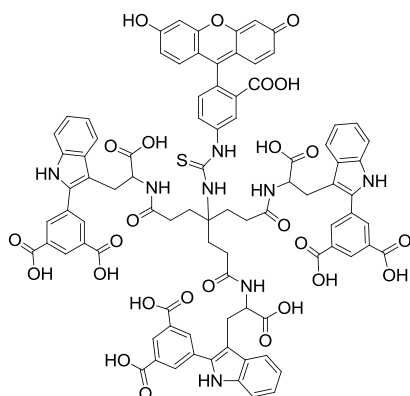


Fmoc protected trimer **2** (100 mg, 0.06 mmol) was dissolved in a solution of piperidine (20%) in DMF (10 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. The residue was evaporated to dryness and then precipitated with dichloromethane/diethyl ether to afford 85 mg (98%) of **3** as an amorphous yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.53 (s, 3H, NH-1^{Trp}),

8.45 (s, 3H, Ar), 8.40 (s, 6H, Ar), 8.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, NHCO), 7.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H, Ar), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H, Ar), 7.13 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 7.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, Ar), 4.51 (q, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 3.92 (s, 18H, OCH_3), 3.41–3.15 (m, 15H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$ and OCH_3), 2.00–1.90 (m, 6H, CH_2), 1.30–1.20 (m, 6H, CH_2). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.436 min.

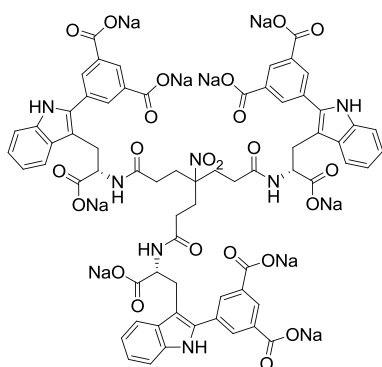
Protected fluorescent (4)

DIPEA (12 μ L, 0.07 mmol) was added to a solution of amine **3** (50 mg, 0.035 mmol) in DMF (5 mL) at 0 °C (ice-bath) and the mixture was stirred for 10 minutes. Then fluorescein 5(6)-isothiocyanate (20.4 mg, 0.05 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The residue was evaporated to dryness and purified by CCTLC using dichloromethane/methanol (9:1) as eluent to afford 41 mg (65%) of **4** as an amorphous yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.55 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 10.13 (bs, 2H, NH-CS-NH), 9.77 (bs, 1H, OH), 8.45 (s, 3H, Ar), 8.41 (s, 7H, Ar), 8.39 (bs, 3H, NHCO), 7.74 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.62 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.16 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.12 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.04 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 6.68 (d, J = 2.2 Hz, 2H, Ar), 6.63–6.53 (m, 4H, Ar), 4.55 (q, J = 7.4 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.92 (s, 18H, OCH₃), 3.40–3.35 (m, 3H, β -CH₂Trp), 3.29 (s, 9H, OCH₃), 3.27–3.22 (m, 3H, β -CH₂Trp), 2.12–1.90 (m, 12H, CH₂). HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 9.790 min.

Fluorescent 5

To a solution containing compound **4** (21 mg, 0.012 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C (ice-bath), a solution of LiOH·H₂O (8.7 mg, 0.21 mmol) in water (2 mL) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then 1 N hydrochloric acid aqueous solution was added to reach pH = 2, and volatiles were evaporated to dryness. The residue was dissolved in isobutanol (20 mL) and washed with H₂O (3 x 20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The

compound was precipitated with diethyl ether to afford 19 mg (quant) of **5** as an amorphous yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.44 (s, 3H, NH-1ⁱTrp), 8.48–8.44 (m, 4H, Ar), 8.40 (s, 6H, Ar), 8.26 (d, J = 7.6 Hz, 3H, NHCO), 7.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.70 (d, J = 7.9 Hz, 3H, Ar), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 3H, Ar), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.10 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 6.69–6.66 (m, 2H, Ar), 6.62–6.54 (q, J = 9.0 Hz, 4H, Ar), 4.53 (q, J = 7.5 Hz, 3H, α -CHTrp), 3.41–3.35 (m, 3H, β -CH₂Trp), 3.20 (dd, J = 13.9, 6.3 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 2.15–1.91 (m, 12H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 179.8, 173.5, 172.3, 169.1, 167.1, 159.9, 152.3, 147.1, 142.3, 136.6, 134.2, 133.9, 133.0, 132.5, 129.5, 129.2, 129.0, 126.7, 122.4, 119.7, 119.5, 113.0, 111.7, 110.3, 109.1, 102.7, 100.0, 83.4, 59.7, 53.5, 30.6, 29.8, 27.6. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.952 min. HRMS (ESI) m/z : calculated for C₈₈H₇₀N₈O₂₆S 1686.4122; found 1686.4119.

Sodium salt (6)

To a solution of trimer **AL-470** (trimer **21** in chapter 3) (150 mg, 0.11 mmol) in acetone/water 1:9 (15 mL), NaHCO_3 (85.4 mg, 1.02 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The residue was evaporated to dryness and co-evaporated with CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 8.19 (d, $J = 1.7$ Hz, 3H, Ar), 8.10 (d, $J = 1.6$ Hz, 6H, Ar), 7.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, Ar), 7.16 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Ar), 6.88–6.78 (m, 6H, Ar), 4.40 (dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz, 3H, α -CHTrp), 3.52 (dd, $J = 14.9, 5.0$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.14 (dd, $J = 14.9, 10.6$ Hz, 3H, β -CH₂Trp), 1.34–1.23 (m, 3H, CH₂), 1.20–1.06 (m, 6H, CH₂), 0.61–0.41 (m, 3H, CH₂). ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ : 178.3, 174.7, 172.9, 161.1, 137.1, 135.6, 135.3, 132.76, 130.8, 129.1, 128.3, 122.2, 119.6, 118.9, 111.4, 107.9, 92.1, 54.9, 30.0, 29.9, 27.0. HPLC [gradient: A:B, 10-100% of A in 10 min]: 6.926 min.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donkers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.-J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. Optimization of a class of tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication leads to a selective, specific and low-nanomolar inhibitor of clinical isolates of enterovirus A71. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 5064-5067.
2. Daelemans, D.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Pannecouque, C. A time-of-drug-addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 925-933.
3. Dragovich, P.S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Marakovits, J. T.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Lee, C. A.; Ford, C. E.; Burke, B. J.; Rejto, P. A.; Hendrickson, T. F.; Tuntland, T.; Brown, E. L.; Meador III, J. W.; Ferre, R. A.; Harr, J. E. V.; Kosa, M. B.; Worland, S. T. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 4. Incorporation of P1 lactam moieties as L-glutamine replacements. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1213–1224.
4. Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Willebrords, R.; Van Eemeren, K.; Stokbroekx, R., Janssen, P. A. J. In vitro activity of pirodavis (R 77975), a substituted phenoxy pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**, 36, 100–107.
5. Rivero-Buceta, E.; Sun, L.; Martínez-Gualda, B.; Doyagüez, E.G.; Donkers, K.; Quesada, E.; Camarasa, M.-J.; Delang, L.; San-Félix, A.; Neyts, J.; Leyssen, P. Optimization of a class of tryptophan dendrimers that inhibit HIV replication leads to a selective, specific and low-nanomolar inhibitor of clinical isolates of enterovirus A71. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 5064-5067.
6. Rombaut, B.; Andries, K.; Boeye, A. A comparison of WIN 51711 and R 78206 as stabilizers of poliovirus virions and procapsids. *J. Gen. Virol.* **1991**, 72 (Pt 9), 2153-2157.
7. Wang, Y.; Qing, J.; Sun, Y.; Rao, Z. Suramin inhibits EV71 infection. *Antiviral Research*, **2014**, 103, 1–6.
8. Arita, M.; Wakita, T.; Shimizu, H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity. *J. Gen. Virol.* **2008**, 89, 2518-2530.
9. Tijsma, A.; Thibaut, H. J.; Spieser, S. A. H.; De Palma, A.; Koukni, M.; Rhoden, E.; Oberste, S.; Purstinger, G.; Volny-Luraghi, A.; Martin, J.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Neyts, J.; Leyssen, P. H1PVAT is a novel and potent early-stage inhibitor of poliovirus replication that targets VP1. *Antiviral Research*, **2014**, 110, 1-9.
10. Nishimura, Y.; Lee, H.; Hafenstein, S.; Kataoka, C.; Wakita, T.; Bergelson, J. M. and Shimizu, H. Enterovirus 71 binding to PSLG-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. *PLOS Pathog.* **2013**, 9 (7), 1-12.

11. Nishimura, Y., Wakita, T. and Shimizu, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* **2010**, 6 (11), 1-9.
12. Tijsma, A.; Franco, D.; Tucker, S.; Hilgenfeld, R.; Froeyen, M.; Leyssen, P.; Neyts, J. The capsid binder vapendavir and the novel protease inhibitor SG85 inhibit enterovirus 71 replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 6990–6992.
13. Preciado, S.; Mendive-Tapia, L.; Albericio, F.; Lavilla, R. J. Synthesis of C-2 arylated tryptophan amino acids and related compounds through palladium-catalyzed C–H activation. *Org. Chem.* **2013**, 78, 8129-8135.

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES GENERALES

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito una familia de dendrímeros de triptófano con actividad dual frente a VIH y EV71. El prototipo de esta familia es el dendrímero **AL-385**, con un esqueleto central de pentaeritritol, espaciadores trivalentes y 12 triptófanos con los ácidos libres en la periferia. Con el fin de determinar los requisitos estructurales necesarios para la actividad, se han llevado a cabo modificaciones tanto en la periferia como en los espaciadores de dicho prototipo. El trabajo realizado con esta finalidad se recoge en los capítulos 1 y 2 de esta memoria. Las principales conclusiones han sido las siguientes:

Con respecto a la periferia (capítulo 1), se llevaron a cabo modificaciones que consistieron en la sustitución del triptófano por otros aminoácidos, tanto aromáticos (fenilalanina y tirosina) como no aromáticos (alanina), así como triptamina (análogo de Trp sin grupo ácido) y *N*-Metil Trp.

Los resultados biológicos obtenidos para estos compuestos indican que la presencia de aminoácidos aromáticos tales como triptófano o tirosina, con cadenas laterales aromáticas sustituidas con grupos polares como NH y OH respectivamente, es crucial para la actividad frente a VIH y EV71. También resulta crucial, la presencia de grupos ácidos libres en la periferia, ya que el derivado de triptamina, sin grupos ácidos, resultó inactivo frente a ambos virus.

A nivel sintético, en este capítulo se describe la puesta a punto de una nueva metodología sintética basada en una aproximación convergente que condujo a mejor rendimiento del compuesto **AL-385** que la aproximación divergente empleada hasta ese momento. Además, la aproximación convergente hizo posible la preparación de los derivados de triptamina y *N*-Metil Trp, cuya síntesis mediante la aproximación divergente no fue posible o resultó poco eficaz.

Estudios de SPR llevados a cabo con los compuestos más activos (**9** y **23**) demostraron que dichos compuestos son capaces de interactuar con las glicoproteínas gp120 y gp41 presentes en la cubierta viral del VIH, siendo el derivado *N*-Metilado de triptófano **23** el que mejor interacción mostró. Las constantes de afinidad (K_D) obtenidas para los complejos **23**-gp120 y **23**-gp41, fueron mejores que las observadas para el prototipo. Además, ensayos de tiempo de adición confirmaron que el compuesto **23** inhibe una etapa temprana del ciclo replicativo del VIH, concretamente la entrada del virus en la célula huésped.

En el capítulo 2, se describe la síntesis de dendrímeros de triptófano en los que se sustituyeron los espaciadores trivalentes presentes en el prototipo **AL-385**, por otros espaciadores con menor (bivalentes) o mayor (tetraivalentes) grado de ramificación con el fin de disponer de forma diferente los triptófanos de la periferia en el espacio. Para la síntesis de

estos compuestos se utilizaron aproximaciones tanto divergentes (espaciadores bivalentes) como convergentes (espaciadores tetravalentes).

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que tanto los dendrímeros con espaciadores bivalentes como los que poseen espaciadores tetravalentes mostraron actividad anti-VIH muy similar a la del prototipo **AL-385**. Este resultado sugiere que la naturaleza del espaciador no desempeña un papel crítico en la actividad anti-VIH.

A diferencia de lo observado para el VIH, los dendrímeros con espaciadores bivalentes fueron inactivos frente a EV71, mientras que aquellos que tenían espaciadores tetravalentes mostraron actividades similares a la del prototipo **AL-385**.

Además, los compuestos con espaciadores tetravalentes mostraron actividad moderada, pero significativa, frente al virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), un herpes genital que facilita la transmisión del VIH y aumenta su virulencia. Hasta el momento, los compuestos sintetizados en nuestro grupo de investigación, entre ellos el prototipo **AL-385**, no habían mostrado actividad frente a la replicación del VHS-2. De ahí el interés de los compuestos con espaciadores tetravalentes descritos en el capítulo 2 de esta memoria. Dichos compuestos podrían ser buenos candidatos para el desarrollo de microbicidas capaces de inhibir la replicación del VIH y VHS-2.

El objetivo del trabajo que se describe en el capítulo 3 de esta memoria era la síntesis de compuestos activos frente a VIH y EV71, de menor peso molecular que el prototipo **AL-385**. Para ello se sintetizaron el trímero **I** y el tetrámero **II** en los que se eliminaron los espaciadores presentes en el prototipo y los triptófanos se unieron directamente al esqueleto central. Dichos compuestos resultaron inactivos frente a VIH y EV71.

Con la hipótesis de que las interacciones “extras” con el sitio de unión podrían ser beneficiosas para la actividad, decidimos introducir en los triptófanos presentes en **I** y **II** anillos aromáticos diferentemente sustituidos. Dichos anillos se introdujeron en las posiciones C2, C7 y N1 del anillo de indol de las cadenas laterales de los triptófanos. La síntesis de los derivados arilados en C2 y C7 se llevó a cabo mediante una metodología sintética puesta a punto en esta Tesis Doctoral basada en reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio, mientras que la arilación en posición N1 se llevó a cabo mediante reacciones de alquilación en medio básico.

Los resultados biológicos obtenidos con dichos compuestos indicaron que las posiciones C2 y C7 del anillo de indol son críticas para la actividad, ya que tan solo los compuestos sustituidos en dichas posiciones con anillos aromáticos portadores de 1 o 2 grupos ácidos resultaron activos frente a VIH y EV71. El desplazamiento de dichos anillos aromáticos a la posición N1 condujo a compuestos inactivos frente a ambos virus lo que sugiere que el NH del anillo de indol es importante para la actividad.

El prototipo de los compuestos descritos en el capítulo 3 es el trímero **21 (AL-470)** que posee mejor actividad frente a VIH (un orden de magnitud) y similar actividad frente a EV71 que **AL-385**. Este nuevo prototipo tiene numerosas ventajas con respecto al anterior, el dendrímero **AL-385**. En primer lugar, el tamaño del trímero **AL-470** es bastante menor que el de **AL-385** (1328.20 Da frente a 3575.84 Da) por lo que es probable que sus propiedades farmacocinéticas sean más adecuadas para los ensayos biológicos. Además, el grupo NO₂ presente en el punto focal de **AL-470** puede transformarse en un grupo NH₂ y de esta forma la molécula tendría un punto de diversidad para su derivatización, algo difícil de conseguir con el dendrímero **AL-385**. Por otra parte, la síntesis de **AL-470** es mucho más sencilla y menos costosa que la de **AL-385**. Todas estas propiedades hacen del compuesto **AL-470**, descubierto en la presente Tesis Doctoral, un candidato ideal con el que seguir trabajando en la búsqueda de inhibidores duales de la replicación del VIH y EV71.

En el capítulo 4 se describen los estudios biológicos llevados a cabo hasta el momento para determinar tanto el mecanismo de acción frente a EV71 como la actividad *in vivo* de los prototipos **AL-385** y **AL-470**.

Un experimento de tiempo de adición llevado a cabo con el dendrímero **AL-385** reveló que dicho compuesto inhibe la entrada del EV71 en la célula huésped. Además, un ensayo de termo-estabilidad mostró que **AL-385** tiene un comportamiento similar a la suramina, un inhibidor de entrada que interacciona con la región de carga positiva de la cápsida viral, y distinto al del pirodavir, un inhibidor de entrada que se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1. Este resultado sugiere que **AL-385** no se une al bolsillo hidrófobo de la proteína estructural VP1 y debe su acción inhibitoria a otro tipo de interacción.

Se seleccionaron dos cepas virales resistentes al prototipo **AL-385**, cuya caracterización reveló la existencia de mutaciones en dos aminoácidos (S184T y P246S) presentes en la cubierta viral. En concreto, dichos aminoácidos se encuentran en una región de la proteína estructural VP1 situada alrededor del eje central de la unidad icosaédrica que posee carga positiva. Esta región está muy expuesta al medio y juega un papel muy importante en la unión del virus al receptor celular. Una vez identificadas las mutaciones S184T y P246S, se crearon virus recombinantes mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Estos virus recombinantes fueron menos susceptibles a la acción inhibitoria de **AL-385** que el virus no mutado, mientras que no se observaron cambios significativos a la acción de otros inhibidores de entrada descubiertos hasta el momento (varendavir, pirodavir y suramina). Este resultado sugiere que **AL-385** no comparte el mismo sitio de unión que dichos inhibidores, y por tanto pertenece a una familia farmacológica diferente.

Con el segundo prototipo (**AL-470**) se llevó a cabo un experimento de resistencia cruzada en el que se observó que los virus recombinantes fueron más susceptibles a la acción inhibitoria de **AL-470** que a la acción de **AL-385**. Este resultado sugiere que el punto de

interacción de ambos compuestos no es el mismo aunque si podría estar cerca o incluso solapar.

Para obtener más información acerca de la presencia y localización de **AL-470** en la cápsida viral, se están llevando a cabo experimentos de fluorescencia. Para ello, se ha sintetizado un derivado fluorescente marcado con fluoresceína. Dicho compuesto resultó 8 y 16 veces, respectivamente, más activo que los prototipos **AL-385** y **AL-470** frente a EV71. Sin embargo, los resultados de fluorescencia obtenidos por el momento no han sido concluyentes.

Finalmente, con el fin de realizar ensayos *in vivo* en un modelo de ratón infectado con EV71, se preparó la sal sódica de **AL-470** (compuesto **6**, capítulo 4) que resultó 74 veces más soluble que el prototipo **AL-470** en disolución acuosa (PBS). Además, estudios de estabilidad química mostraron que dicha sal es estable con el tiempo a distintos pHs (1.5, 5.5 y 7.4). Estos resultados ponen de manifiesto que el compuesto **6** es un buen candidato para llevar a cabo los ensayos *in vivo* propuestos, que ya se han iniciado.

Métodos Generales

MÉTODOS GENERALES

Commercial reagents and solvents were used as received from the suppliers without further purification unless otherwise stated. The solvents used in some reactions were dried prior to use. Tetrahydrofuran (THF) was pre-dried overnight over potassium hydroxide (KOH) and then was dried by distillation from Na/benzophenone and stored over Linde type activated 4Å molecular sieves. Toluene was dried by distillation from CaH and stored over Linde type activated 4Å molecular sieves. DMF dry was commercially available (Aldrich).

A microwave reactor EmrysTM Synthesizer (Biotage AB) was used for the reactions which needed microwave irradiation.

Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on aluminum plates pre-coated with silica gel 60 (F₂₅₄, 0.20 mm). Products were visualized using an ultraviolet lamp (254 nm and 365 nm) or by heating after treatment with a 5% solution of phosphomolybdic acid (PMA) or vanillin in ethanol.

The compounds were purified by: a) high performance flash chromatography (HPFC) with a system "Isolera One" (Biotage) in reverse phase using water/acetonitrile (100:0 to 0:100) as eluent, b) flash column chromatography on silica gel (60 Merck 230-400 mesh), c) preparative centrifugal circular thin layer chromatography (CCTLC) on a chromatotron^R (Kieselgel 60 PF254 gipshaltig, Merck) layer thickness 1 mm, flow rate 2–4 ml/min.

The purity of final compounds was at least 95% and has been determined by HPLC analysis and high resolution mass spectrometry (HRMS, "exact mass").

For HPLC analysis an Agilent Technologies 1120 Compact LC with a reverse phase column ACE 5 C18-300 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm) equipped with a PDA (Photo Diode Array) detector was used. Acetonitrile was used as mobile phase A, and water 0.05% of TFA was used as mobile phase B with at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. All retention times are quoted in minutes and the gradients are especified for each compound in the experimental data.

For high resolution mass spectrometry (HRMS) was used an Agilent 6520 Accurate Mass QTOF (quadrupole time of flight) coupled with LC/MS using an electrospray interface (ESI) working in the positive-ion (ESI⁺) and negative-ion (ESI⁻) mode.

NMR spectra (¹H, ¹³C NMR) were recorded on a Varian UNIT INOVA-300 (300 MHz), Bruker AVANCE 300 (300 and 75 MHz), Varian INOVA-400 (400 and 100 MHz), Varian MERCURY-400 (400 and 100 MHz) and Varian-500 (500 and 125 MHz) spectrometers, using (CD₃)₂SO and CDCl₃ as solvents. Chemical shift (δ) values are reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) in ¹H and CDCl₃ (δ = 77.0) in ¹³C NMR. Coupling constant (*J* values) are reported in hertz (Hz) and multiplicities of signals are indicated by the following symbol: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) and bs (broad

singlet). Some two-dimensional spectra (COSY, HSQC and HMBC) were performed to identify the structure.

Final compounds were lyophilized using a Telstar 6-80 system.

Solubility assay

Excess amount of the tested compound was added to 200 μL of PBS buffer and the resulting suspension was shaken at room temperature for 24 h on a rotary shaker. The samples were centrifuged at 135 rpm in a Hettich microcentrifuge for 15 min at room temperature. Finally, 160 μL of the clear supernatant were transferred in a quartz microplate and were diluted by adjunction of 40 μL of $\text{CH}_3\text{CN}:\text{DMSO}$ (8:2) solution. The solubility was determined using UV detection with a UV-Vis detector (Thermo Electron Corporation, Multiskan^R Spectrum) to 330 nm and comparison with calibration standards previously prepared. Standards are made in an $\text{PBS}:\text{CH}_3\text{CN}$ (8:2) and DMSO at 5% (v/v) ensuring that the final solvent content of all standards and samples remains consistent. The concentrations of the 5 standard calibrators were 0 μM , 10 μM , 100 μM , 250 μM , 350 μM and 500 μM . A standard solution with a known concentration was used to validate the calibration curve.

Stability assay

The tested compounds were exposed at 100 μM in 5% DMSO to different buffers (HCl/NaCl, AcOH/AcONa and PBS) and incubated at 37 °C. Aliquots were analyzed at different time periods (0, 2, 6 and 24 h) by LC/MS, with a Waters 2629 Separation Module with a reverse phase column Sunfire^R C18 (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm) coupled with a Waters 2996 Photodiode Array Detector and with a Waters Micromass ZQ using an electrospray interface (ESI), and mobile phase A: acetonitrile, B: water and C: 2% formic acid in water. In all cases the gradient was 40:55:5 (A:B:C) at $t = 0$ min to 95:0:5 (A:B:C) at $t = 10$ min. The flow rate was 1 mL/min.

Biological methods

Anti-HIV activity assay

The compounds were evaluated for their inhibitory activity against HIV-1 (NL4.3) and HIV-2 (ROD) infection in MT-4 cell cultures. Briefly, MT-4 cells (1×10^6 cells/mL) were pre-incubated for 30 min at 37°C with the test compounds in a 200 μL 96-well plate. Next, NL4.3 virus was added at 100 CCID₅₀ of the viral stock. The cytopathic effect was scored microscopically 5 days post-infection, and the 50% effective concentration (EC₅₀) values were determined using the MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) method.^{1,2}

Surface Plasmon Resonance experiments for evaluation of the binding of the compounds to gp120 and gp41^{3,4}

Recombinant gp120 protein from the HIV-1 IIIB strain (ImmunoDiagnostics Inc., Woburn, MA) (produced in cell cultures of chinese hamster ovary cell cultures) and recombinant gp41 HIV-1(HxB2) (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) were covalently immobilized on the carboxymethylated dextran matrix of a CM5 sensor chip in 10 mM sodium acetate, pH 4.0, using standard amine coupling chemistry. All interaction studies were performed at 25 °C on a Biacore T200 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The compounds were diluted in HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl and 0,05% surfactant P20; pH 7.4), and supplemented with 5% dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck) and 10 mM Ca^{2+} at a concentration of 50 μM . Samples were injected for 2 minutes at a flow rate of 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ followed by a dissociation phase of 2 minutes. The sensor chip surface was regenerated with an injection of 50 mM NaOH. A reference flow cell was used as a control for non-specific binding and refractive index changes. Several buffer blanks were used for double referencing. A DMSO concentration series was included to eliminate the contribution of DMSO to the measured response. The binding affinity (K_D) of the compounds was calculated based on the data obtained in the sensorgram.

Binding affinities (K_D) were calculated using a CM5 sensor chip at which gp120 or gp41 were immobilized. For this purpose compound concentrations ranging between 0.78 and 12.50 μM were used and the K_D value was derived from steady state analysis in the Biacore T200 Evaluation Software 2.0. The formula used to calculate the K_D value was: $\text{Req} = C \cdot R_{\text{max}} / (K_D + C)$, where Req = equilibrium binding level; R_{max} = maximum binding level; K_D = equilibrium dissociation constant; C = concentration of analyte.

Antiviral activity against EV71

BrCr laboratory adapted strain and EV71 clinical isolated representative of B genogroup (B2 sub-genogroup: 11316; B5 sub-genogroup: TW/96016/08 and TW/70902/08) and C genogroup (C2 sub-genogroup: H08300 461#812; C4 subegenogroup: TW/1956/05 and TW/2429/04) were used at a low multiplicity of infection (MOI) in a standardized antiviral assay. Briefly, a serial dilution of the compounds was prepared in assay medium that was added to an empty microtiter 96 well-plate, after which the virus inoculum was added first, followed by a suspension of freshly harvested rhabdomyosarcoma (RD) cells (2×10^4 cells/well). While the cells were settling to the bottom, the virus was allowed to infect them in the presence of compound. The assay plates were incubated at 37 °C, 5% CO_2 with virus inoculum and compounds until full virus-induced cell death was observed in the untreated, infected controls (3–4 days post-infection). Subsequently, the antiviral effect was quantified using a colorimetric readout with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/phenazine methosulfate (MTS/PMS method)² and the concentration of compound at which 50% inhibition of virus-induced cell death would be observed (EC_{50}) was calculated from

the antiviral dose-response curves. A similar assay setup was used to determine the adverse effect of the compound on uninfected, treated cells for calculation of the CC_{50} (concentration of compound that reduces overall cell health with 50% as determined by the MTS/PMS method).

Time of addition experiment (TOA)⁵

RD cells infected with BrCr laboratory, grown in 24-well assay plates, were treated with test compounds at different times (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, and 25 h) after infection. Product added at time point 0 h, was present during the start of infection and was washed away after 1 h. After washing, fresh product was added to maintain viral suppression throughout the rest of the experiment. The experiment contains two control antivirals; a capsid binding agent such as pirodavisir, and a non-capsid agent such as rupintrivir (a protease inhibitor).

Thermo-stability assay⁶

BrCr (10^7 TCID₅₀/ml) was incubated in the presence of test compounds (at a concentration of 50 times the EC₅₀) or an equal volume of DMSO at 12 different temperatures ranging from 42.9 °C to 57.1 °C for 2 min after which the samples were rapidly cooled to 4 °C. Following this, the TCID₅₀/ml of each condition was determined by means of end-point titration.

Fluorescent assay⁷

RD cells in 8-well chamber slides (Lab-Tek) were infected with EV71 (MOI, 3) at 4°C for an hour. After 1 h of incubation, the inocula were removed, wash 3 times with PBS. Then the cells were fixed with 4% formaldehyde. The fixed cells were permeabilized using 0.25% Triton X-100 (Sigma) for 5 min. wash 3 times with PBS. Blocking: Incubate cells with 1% BSA in PBST (PBS + 0.1% Tween 20) for 30 min to block unspecific binding of the antibodies. Staining: Incubate cells in the diluted compound (6 µM) in 1% BSA in PBST in a humidified chamber for 1 h at room temperature. Wash 3 times with PBS.

For nuclear visualization, cells were treated with 0.01% DAPI for 7 min at room temperature. Immunofluorescence was detected with a confocal microscope.

EV71 particles were immunostained with mouse anti-EV71 monoclonal antibodies (Millipore) as the primary antibodies and Alexa Fluor 568-labeled anti-mouse IgG (Invitrogen) as the secondary antibody for 1 h at 37 °C.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyter, J.; De Clercq, E. Rapid and automated-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods*, **1988**, 20, 309-321.
2. Buttke, M. T.; McCubrey, J. A.; Owen, T. C. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J. Immunol. Methods*, **1993**, 157, 233-240.
3. Lowe, C. R. An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors*, **1985**, 1, 3-16.
4. Johnsson, B., Löfås S.; Lindquist, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 268-277.
5. Martín, J. *Poliovirus Methods and Protocols*. **2016**. Division of Virology, NIBSC, Hertfordshire, UK, Humana Press. ISSN 1064-3745.
6. Rombaut, B.; Andries, K.; Boeye, A. A comparison of WIN 51711 and R 78206 as stabilizers of poliovirus virions and procapsids. *J. Gen. Virol.* **1991**, 72 (Pt 9), 2153-2157.
7. www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol